



**DENEYSEL BÖBREK
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI
OLUŞTURULAN SIÇANLARDA
MYRTENAL'İN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Leyla BEYTUR
ANATOMİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Evren KÖSE

Doktora Tezi- 2024

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN
SIÇANLARDA MYRTENAL'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Leyla BEYTUR

Anatomi Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**Tez Danışman
Prof. Dr. Evren KÖSE**

**Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Evren KÖSE
Prof. Dr. Cemil ÇOLAK
Prof. Dr. Hıdır PEKMEZ
Doç. Dr. Mustafa CANBOLAT
Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Furkan ARPACI**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TDK-2023-3271 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2024**

KABUL ONAY SAYFASI



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Prof. Dr. Evren KÖSE danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Deneysel Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Myrtenal’in Etkilerinin Araştırılması” başlıklı **Doktora** tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 12/07/2024

Leyla BEYTUR

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ix
ABSTRACT	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbreğin Yapısı	3
2.1.1. Nefronlar	4
2.1.2. Böbreğin Kanlanması	6
2.2. Böbrek Fonksiyonları	7
2.3. Böbrek Fonksiyonunu Değerlendirmede Kullanılan Kavramlar	8
2.3.1. Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR)	8
2.3.2. Üre	8
2.3.3. Serum Kreatinin.....	9
2.4. Akut Böbrek Hasarı	10
2.4.1. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı	11
2.4.2. İskemi Hasarı	11
2.4.3. Reperfüzyon Hasarı	11
2.5. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri	13
2.5.1. Süperoksit Radikali.....	13
2.5.2. Hidrojen Peroksit	14
2.5.3. Hidroksil Radikali.....	14
2.5.4. Singlet Oksijen.....	15
2.5.5. Nitrik Oksit	15
2.5.6. Peroksinitrit.....	15
2.6. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Bileşenlerine Etkisi.....	15
2.6.1. Proteinlere Etkisi.....	16
2.6.2. Lipitlere Etkisi	17
2.6.3. DNA'ya Etkisi	18
2.7. Antioksidan Sistemler.....	18
2.7.1. Enzimatik Antioksidanlar	18

2.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	20
2.8. Böbrek Hasar Belirteçleri	21
2.8.1. Nötrofil Jelatinaz ile İlişkili Lipokalin.....	21
2.8.2. Kidney Injury Marker-1	22
2.8.3. Cystatin C	23
2.8.4. Interleukin 18.....	24
2.9. Monoterpenler.....	24
2.10. Myrtenal.....	25
2.10.1. Myrtenalin Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkileri.....	25
2.10.2 Myrtenalin Antikanserojen Özellikleri	26
2.10.3 Myrtenalin Antidiyabetik Özellikleri.....	27
2.10.4. Myrtenalin Analjezik Özellikleri	28
2.10.5. Myrtenalin Nöroprotektif ve MSS'yi Etkileyen Özellikleri	28
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez	31
3.2. Gruptaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi.....	31
3.3. Hayvanların Gruplara Ataması	31
3.4. Deney Hayvanları ve Gruplarının Oluşturulması	31
3.5. Cerrahi Uygulama.....	32
3.6. Dokuların Toplanması	34
3.7. Dokuların Biyokimyasal Analize Hazırlanması	34
3.7.1. SOD Enzim Aktivitesinin Ölçümü	35
3.7.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin ölçümü	35
3.7.3. Glutatyon Ölçümü.....	36
3.7.4. Malondialdehit Ölçümü	37
3.7.5. NGAL, KIM-1, TNF- α ve IL-1 β Düzeyinin Ölçülmesi	38
3.7.6. BUN ve Kreatinin Değerlerinin Ölçümü	38
3.8. İstatiksel Analiz	39
4.BULGULAR.....	40
4.1. Myrt'nin Serum Üre Seviyeleri Üzerine Etkileri.....	40
4.2. Myrt'nin Serum Kreatin Seviyesi Üzerindeki Etkisi	41
4.3. Myrt'nin Serum ve Böbrek NGAL Seviyesi Üzerindeki Etkileri.....	42
4.4. Myrt'nin Serum ve Böbrek KIM-1 Seviyesinin Üzerindeki Etkileri	44
4.5. Myrt'nin Serum ve Böbrek IL- β Seviyesi Üzerindeki Etkileri.....	46

4.6. Myrt'nin Serum ve Böbrek IL- β Seviyesi Üzerindeki Etkileri.....	48
4.7. Myrt'nin SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	50
4.8. Myrt'nin Katalaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	51
4.9. Myrt'nin GSH Seviyesi Üzerine Etkisi	52
4.10. Myrt'nin MDA Seviyesi Üzerine Etkileri	53
4.11. Histopatolojik Analizler.....	54
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR	68
EKLER.....	88
EK- 1. ÖZGEÇMİŞ	88
EK 2. ETİK KURUL KARARI.....	89

TEŐEKKÖR

Doktora tez çalışmama TDK-2023-3271 no'lu proje ile maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalara Birim'ne (İÜBAP),

Tez araştırmamı destekleyen, katkı ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Evren KÖSE başta olmak üzere bölümümüz tüm öğretim üyelerine, Histoloji analizlerinde katkı ve yardımlarını esirgemeyen İnönü Üniverstiesi Tıp Fakóltesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aslı TAŐLIDERE'ye, Cerrehai operasyonlar ve Biyokimyasal Analizlerde yardımlarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Suat TEKİN'e, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veteriner Hekimi Engin KORKMAZ'a

Tez çalışmalarım süresince gösterdiği anlayış ve desteğinden dolayı eşim ve ocuklarıma;

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teőekkör ederim.

Leyla BEYTUR

ÖZET

Deneyisel Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Myrtenal'in Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Akut böbrek hasar, yoğun bakım ünitelerinde ve vasküler cerrahi operasyonlarda yüksek mortaliteye sebep olan, böbreklerde çok çeşitli fonksiyonel değişikliklere neden olan heterojen bir sendromdur. Myrtenalin (Myrt) çeşitli organ hasarları üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışma, Myrt'nin renal I/R hasarı üzerindeki etkilerini biyokimyasal ve histolojik düzeyde araştırmak ve anlamak için gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve metot: Çalışmada 40 adet erkek *Sprague Dawley* ırkı sıçan kullanılmıştır (n=10). 1. gruptaki hayvanlar sham grubu olup klempleme yapılmamıştır. 2. gruptaki hayvanlara 45 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon sağlanmıştır. 3. ve 4. gruptaki hayvanlara 9 gün boyunca Myrt'nin iki farklı dozu (40-80 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanmış akabinde 45 dakika iskemi ve 24 saat reperfüzyon sağlanmıştır. Deney bitiminde hayvanlar dekapite edilerek kan ve böbrek dokuları histolojik ve biyokimyasal analizler için alınmıştır. Böbrek hasar belirteçleri KIM-1, NGAL; inflamasyon belirteçleri IL-1 β ve TNF- α seviyeleri ELISA yöntemiyle; hücre hasarı seviyesi histopatolojik olarak, apoptotik belirteçlerinden kaspaz-3 reaktivitesi immunohistokimyasal yöntemle, oksidatif stres parametrelerinden MDA, SOD, CAT ve GSH seviyeleri biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir.

Bulgular: I/R grubundaki serum örneklerindeki BUN ve kreatin seviyelerinin sham grubuna kıyasla belirgin bir artış gösterdiği ve bu artışın Myrt uygulaması ile azaldığı gözlemlendi (p<0.05). Ayrıca, iskemiye bağlı olarak böbrek dokusunda MDA, KIM-1, NGAL düzeylerinin arttığı belirlendi (p<0.05); Myrt uygulamasının ise bu belirteçleri düşürdüğü tespit edildi (p<0.05). I/R sonucu azalan GSH seviyesi ile birlikte SOD ve CAT enzim aktivitelerinin Myrt uygulaması ile arttığı belirlendi (p<0.05). Histolojik analizler, Myrt'nin böbrek hasarını ve Kaspaz-3 immunreaktivitesini azalttığını ortaya koydu (p<0.05).

Sonuç: Sonuç olarak, Myrt'nin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu bir rol oynadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, apoptoz, oksidatif stres, myrtenal, inflamasyon

ABSTRACT

Investigation of The Effects Of Myrtenal in Rats with Experimental Renal Ischaemia/Reperfusion Injury

Aim: Acute kidney injury (AKI) is a heterogeneous syndrome that causes a wide range of functional changes in the kidneys, leading to high mortality in intensive care units and vascular surgical operations. Investigations have shown that Myrtenal (Myrt) is known to have positive effects on various organ damages. This study aimed to investigate the effects of Myrt on renal I/R injury biochemically and histologically.

Material and method: Forty male Sprague-Dawley rats (n=10) were used in the study. The sham group (Group 1) clamping wasn't performed., while Group 2 was subjected to 45 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion. In groups 3 and 4, Myrt was administered intraperitoneally at two different doses (40-80 mg/kg) for 9 days, followed by 45 minutes of ischemia and 24 hours of reperfusion. At the end of the experiment, the animals were decapitated and blood and kidney tissues were collected for histological and biochemical analyses. The study examined kidney damage markers, including KIM-1, and NGAL, as well as inflammation markers IL-1 β and TNF- α levels using the ELISA method. Cell damage levels and caspase-3 reactivity were examined histologically. Additionally, oxidative stress parameters, including MDA, SOD, CAT, and GSH levels, were examined using biochemical methods.

Results: Serum samples from the I/R group showed a significant increase in BUN and creatine levels compared to the sham group. This increase was significantly decreased by Myrt administration ($p<0.05$). Additionally, kidney tissue analysis revealed increased levels of MDA, KIM-1, and NGAL due to ischaemia ($p<0.05$). However, Myrt administration significantly decreased these markers ($p<0.05$). It was found that the administration of Myrt resulted in increased SOD and CAT enzyme activities, as well as a decrease in GSH levels due to I/R ($p<0.05$). Histological analysis showed that Myrt significantly reduced renal tissue damage and caspase-3 immunoreactivity ($p<0.05$).

Conclusion: In conclusion, Myrt has a protective effect against ischaemia-reperfusion injury.

Keywords: Kidney, apoptosis, oxidative stress, myrtenal, inflammation

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABH	: Akut Böbrek Hasarı
ADP	: Adenozin Difosfat
AMP	: Adenozin Monofosfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
BUN	: Kan Üre Azotu
Ca²⁺	: Kalsiyum İyonu
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GR	: Glutasyon Redüktaz
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GSH	: Glutasyon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside Glutasyon
GIP	: Glukoz Bağımlı İnsulinotropik
H⁺	: Hidrojen İyonu
HO[•]	: Hidroksil Radikali
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IL-18	: İnterlökin -18
IL-1 β	: İnterlökin -1beta
IL-18	: İnterlökin -18
IL-6	: İnterlökin - 6
I/R	: İskemi Reperfüzyon
K⁺	: Potasyum İyonu
KDH	: Ksantin Dehidrogenaz
KIM-1	: Böbrek Hasar Molekülü-1
KO	: Ksantin Oksidaz
LOO[•]	: Lipit Peroksil
LOOH[•]	: Lipit Hidroperoksit

MDA	: Malondialdehit
Myrt	: Myrtenal
mg/dl	: Miligram/desilitre
mg/kg	: Miligram/kilogram
mg/ml	: Miligram/mililitre
Na⁺	: Sodyum İyonu
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NGAL	: Neutropil Gelatinase-associated Lipocalin
NLRP-3	: Nod Benzeri Reseptör Proteini 3
NO	: Nitrik Oksit
O₂	: Oksijen Molekülü
ONOO⁻	: Peroksinitrit Radikali
PMNL	: Polimorf Nüveli Lökosit
PT	: Proksimal Tübüler
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
RNA	: Ribonükleik asit
ROOH	: Hidroperoksit
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
O₂⁻	: Süperoksit Radikali
¹O₂	: Singlet Oksijen
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
XD	: Ksantin Dehidrogenaz
XO	: Ksantin Oksidaz
μg	: Mikrogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2. 1. Böbreğin Yapısı	3
Şekil 2. 2. Nefron yapısı	4
Şekil 2. 3. Jukstamedüller ve kortikal nefron yapısı.....	5
Şekil 2. 4. Makula densa yapısı	6
Şekil 2. 5. Böbreğin kanlanması.....	7
Şekil 2. 6. GFR oranına göre serum kreatinin ve BUN düzeyleri.	10
Şekil 2. 7. İskemi-reperfüzyonun dokuda neden olduğu hasarın etkileri	13
Şekil 2. 8. Hidrojen peroksit oluşumu	14
Şekil 2. 9. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidroksil oluşması.....	15
Şekil 2. 10. SOD etki mekanizması.....	19
Şekil 2. 11. CAT etki mekanizması.....	19
Şekil 2. 12. Myrt'nin kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2. 13. Myrt'in antitümöral özellikleri.....	27
Şekil 2. 14. Myrt'nin antidiyabetik özellikleri	28
Şekil 2. 15. Myrt'nin MSS'deki antioksidan ve nöromodülatör aktivitesi.....	29
Şekil 2. 16. Tez çalışmasında oluşturulan kurgu	30
Şekil 3. 1. Deney planı.....	32
Şekil 3. 2. Cerrahi işlemler	33
Şekil 4. 1. Deney ve uygulama gruplarının serum üre seviyeleri.....	40
Şekil 4. 2. Deney ve uygulama gruplarının serum kreatinin seviyeleri.....	41
Şekil 4. 3. Deney ve uygulama gruplarının serum NGAL seviyeleri.....	42
Şekil 4. 4. Deney ve uygulama gruplarının böbrek NGAL seviyeleri	43
Şekil 4. 5. Deney ve uygulama gruplarının serum KIM-1 seviyeleri.....	44
Şekil 4. 6. Deney ve uygulama gruplarının böbrek dokusu KIM-1 seviyeleri.....	45
Şekil 4. 7. Deney ve uygulama gruplarının böbrek dokusu IL-1 β seviyeleri.....	46
Şekil 4. 8. Deney ve uygulama gruplarının böbrek dokusu IL-1 β seviyeleri.....	47
Şekil 4. 9. Deney ve uygulama gruplarının serum TNF- α seviyeleri.....	48
Şekil 4. 10. Deney ve uygulama gruplarının böbrek TNF- α seviyeleri.....	49
Şekil 4. 11. Deney ve uygulama gruplarının böbrek dokusu SOD enzim aktivitesi	50
Şekil 4. 12. Deney ve uygulama gruplarının CAT enzim aktivitesi.....	51

Şekil 4. 13. Deney ve uygulama gruplarının GSH seviyesi	52
Şekil 4. 14. Deney ve uygulama gruplarının MDA seviyeleri	53
Şekil 4. 15. Sham grubuna ait böbrek dokusunun histolojik kesiti.	54
Şekil 4. 16. I/R grubuna ait böbrek dokusunun histolojik kesiti.	55
Şekil 4. 17. Myrt-40mg/kg grubuna ait böbrek dokusunun histolojik kesiti.....	56
Şekil 4. 18. Myrt-80mg/kg grubuna ait böbrek dokusunun histolojik kesiti.	57
Şekil 4. 19. Böbrek kesitlerinde Kaspaz-3'ün immünohistokimyasal boyanması.....	58
Şekil 6. 1. Çalışmada gözlemlenen etkiler ve boşluklar.....	67



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3. 1. Grupların bilgisayar algoritması kullanılarak oluşturulması.	31
Tablo 3. 2. CAT analizi için kullanılan reaktifler	36
Tablo 3. 3. Glutasyon analizi için kullanılan reaktifler	36
Tablo 3. 4. MDA analizi için kullanılan reaktifler	37
Tablo 3. 5. MDA analizi için TCA reaktifinin eklenme basamakları	37
Tablo 4. 1. Grupların histopatolojik hasar skorlaması	59



1. GİRİŞ

Akut böbrek hasarı (ABH), genellikle oligüri ile karakterize olan, böbreğin boşaltım fonksiyonlarının aniden kaybı sonucu ortaya çıkan, çoklu organ disfonksiyonu ile ilişkilendirilen bir sendromdur (1). Bu sendrom, hastanede kalış süresinin artmasıyla doğru orantılı olarak yüksek mortalite oranlarına sahiptir (2). ABH dünya genelinde her yıl yaklaşık 13,5 milyon bireyi etkileyerek neredeyse 1,7 milyon ölüme yol açmaktadır (3). ABH, vasküler cerrahi ve böbrek nakil operasyonlarına eşlik eder (4) ve yatan hastalar ile yoğun bakımdaki hastalarda önemli bir komplikasyon olarak gözlemlenebilir. Ayrıca, yoğun bakımda kayıpların önemli bir bölümünden sorumludur (5). Bu hastalığı atlaman bireylerde, ilerleyen dönemlerde kronik böbrek yetmezliği riski oldukça yüksektir (6).

ABH'nin gelişiminde rol oynayan iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, kompleks bir patofizyolojiye sahiptir (7). İskemi sonrası hücre hasarı, reperfüzyon sonrasında iskemik dokudan üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) nedeniyle artmaktadır (8). ROS, esas olarak endojen biyolojik sistemlerde NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri yoluyla olan serbest radikallerden üretilir. I/R, dokularda oksidatif strese neden olarak ROS gibi serbest radikallerinin üretimi yoluyla hasara yol açmaktadır. Artan ROS hücresel yıkıma neden olarak lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) salınımına yol açar (9). Renal dokuda, ROS'a karşı korunmak amacıyla tüm hücreler aktif olarak glutatyon peroksidaz (GSHx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) gibi endojen radikal süpürücüleri içeren antioksidan enzimleri salgırlar. Ancak, I/R sırasında antioksidanların hasara karşı koyma yeteneği azalır. I/R'nin ardından oksidan antioksidan dengenin bozulması ve DNA hasarının oluşması apoptotik süreci başlatır (10). Bu süreçte, renal I/R hasarının temel belirteçlerinden biri olan kaspazların aktivitesi artar (11). Renal I/R'nin ardından, ROS oluşumuyla birlikte nekrotik hücrelerin artışı, inflamatuvar yanıtı tetikler ve proinflamatuvar sitokinlerin aktive olduğu bir kaskadı başlatır (12). Aktive makrofajlar da renal hasarın ardından devreye girer ve TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri serbest bırakır (13). Bu sitokinler, nötrofillerin, monositlerin ve T hücrelerinin hasarlı bölgeye sızması yoluyla inflamasyonu güçlendirir (14).

Şu ana kadar ABH için etkili bir tedavi stratejisi belirlenmemiştir ve mevcut tedavi süreçleri genellikle palyatif niteliktedir (15). Bu nedenle, oksidatif stres, apoptozis ve

inflamasyonu azaltma amacı güden tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, mortaliteyi sınırlamak ve muhtemel komplikasyonları önlemek adına ABH tedavisinde kritik bir adım oluşturabilecektir.

Doğal ürün ve/veya doğal ürün molekülleri, ilaç keşfi ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Son 30 yılda onaylanmış ilaçların yaklaşık %50'si doğrudan veya dolaylı olarak doğal ürünlerden oluşur (16). Myrtenal (Myrt); okaliptüs, nane, biber ve kimyon gibi birçok bitki türünün uçucu yağlarında bulunan terpenoidlerden türetilen bir monoterpen çeşitidir (17, 18). Artan sayıdaki çalışma Myrt'nin antiinflamatuvar, antidiyabetik, antioksidan, analjezik ve antikanserojen özelliklerini iyi tanımlamıştır (19). Literatürde Myrt'nin böbrek I/R hasarına etkisi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Myrt'nin, antiinflamatuvar, antioksidatif özellik göstermesi renal I/R hasarında koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmüştür.

Bu çalışma sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan böbrek I/R hasarında Myrt'nin etkilerini araştırmayı amaçlamıştır.

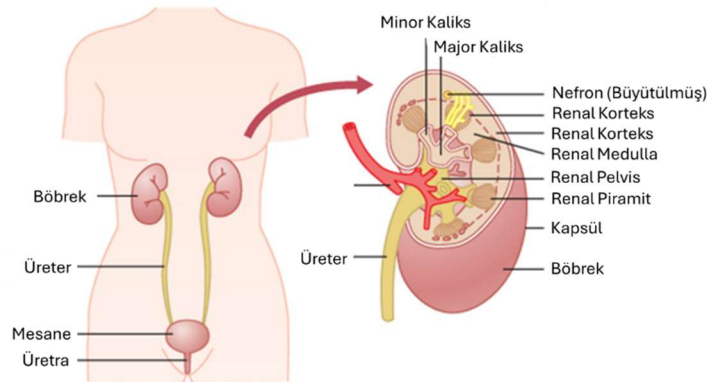
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Yapısı

Böbrekler, retroperitoneal alanda, periton boşluğunun dış sınırlarında, karın arka duvarında konumlanmış olup, her biri yetişkin bir bireyde yaklaşık 150 gram ağırlığındadır. Böbrekler; vasküler ve sinirsel yapıları içeren hilum adı verilen bir bölgeye sahiptir. Bu bölgede üretilen idrarın üreterlerden mesaneye iletilmeden önceki bölge olan pelvis renalis de bulunur (20).

Böbreklerde uzun eksenli boyunca boydan boya uzanan yapısal bir bölünme görülür; bu bölgeler dışta yer alan korteks ve iç kısmında medulla adını alan iki temel bölgedir. Böbrek medullasında, böbrek piramitleri olarak isimlendirilen konik yapılara rastlanır. Bu piramitik yapılar, başlangıçta korteks ve medulla arasında yer alan bir tabanla karakterize edilir ve anatomik yapının üst noktasından aşağıya doğru uzanarak, üreterin üst ucuyla birleşen bir papillada sonlanır.

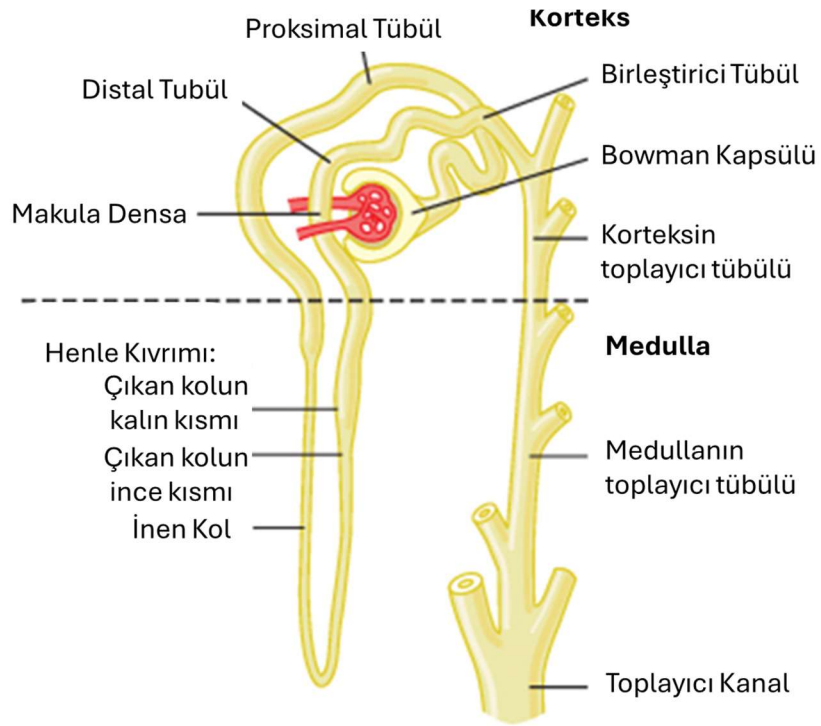
Renal pelvis, üreterin üst alanından başlayarak idrarı pelvik boşluğundan mesaneye taşıyan bir yapıyı kapsar. Renal pelvis, majör kaliks olarak isimlendirilen 2-3 ayrı bölgeye ayrılır. Majör kaliksler ise, idrarın papilladan türemesi ve taşınması sürecinde temel bir organizasyonu temsil eder, bu yapılar papilladan kaynaklanan idrarın sistemik bir düzene göre bölünerek aktarılmasında ara bağlantı işlevini yerine getiren minör kalikslere ayrılır. Bu yapılar, pelvis ve üreterin duvarlarında bulunan düz kas dokusu tarafından desteklenir. Bu kasların koordineli kasılması, idrarın mesaneye düzenli bir şekilde iletilmesini sağlar (21)



Şekil 2. 1. Böbreğin Yapısı (21)

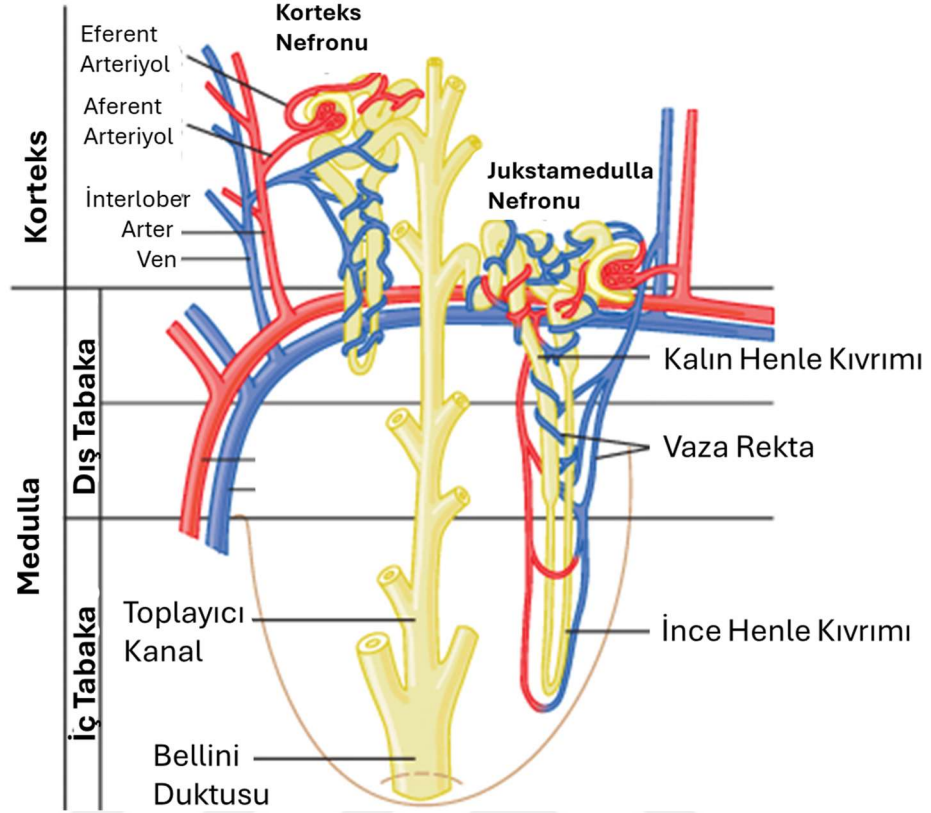
2.1.1. Nefronlar

Her bir böbrekteki yaklaşık bir milyon nefron, böbreklerin karmaşık işlevselliğini sağlayan temel yapı taşlarıdır (Şekil 2.2.). Ancak; böbrek hasarına yol açan patolojik durumlar ve yaşlanma ile nefron sayısında azalmalar meydana gelir. Özellikle 40 yaşından sonra, nefronların sayısında kademeli bir düşüş gözlemlenir. Nefronlar, glomerülünden süzülen filtratın uzun bir tübül boyunca idrara dönüştüğü karmaşık bir düzenleme mekanizmasını içerir (22)



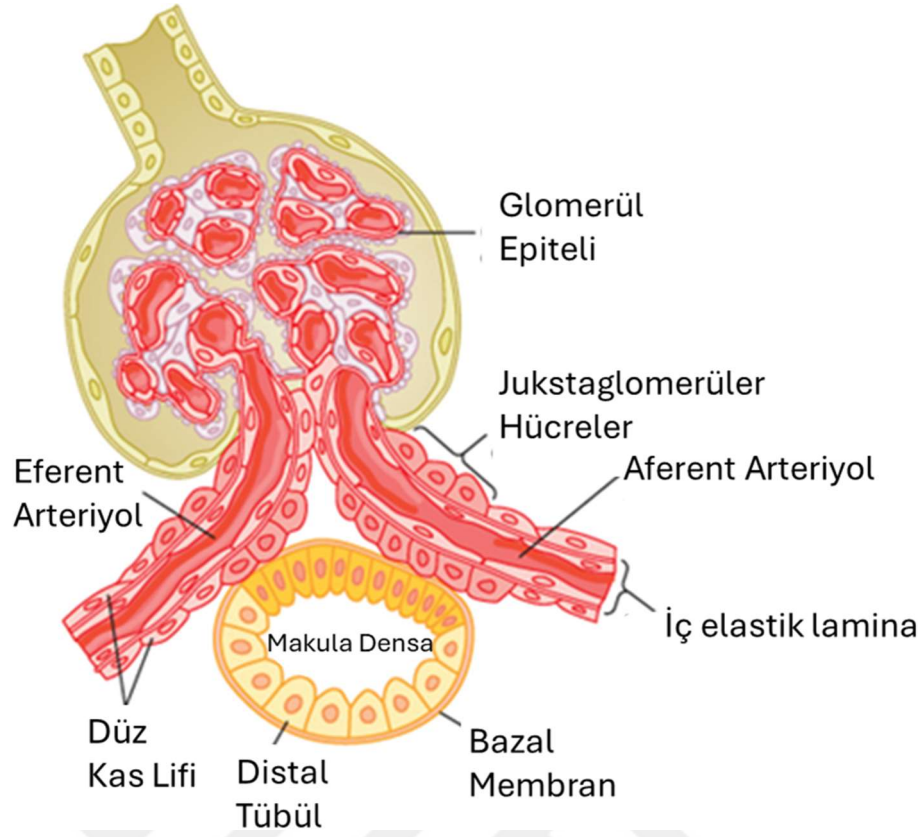
Şekil 2. 2. Nefron yapısı (21)

Böbreklerde iki farklı tipte nefron bulunmaktadır, bunlar korteks nefronları ve jukstamedullar nefronlardır. Korteks nefronları, glomerülü korteksin dış kısmında bulunan nefronlardır ve bunların henle kulpları kısa mesafeye iner. Diğer bir tip olan jukstamedullar nefronlar ise glomerülleri korteksin nispeten daha derin kısmında bulunur ve henle kıvrımları çok uzun bir mesafeye inerek medullanın derinliklerine kadar uzanır. Bu nefron tiplerinin anatomik farklılıkları, böbreklerin idrar oluşum süreçlerindeki çeşitliliği yansıtarak homeostatik dengeyi destekler (21). Farklı nefron tipleri Şekil 2.3. te şematize edilmiştir



Şekil 2. 3. Jukstamedüller ve kortikal nefron yapısı (21)

Nefronda süzülme sağlayan temel yapılar glomerüllerdir. Glomerül kapiller ağı, diğer kapiller sistemlerle kıyaslandığında daha yüksek bir hidrostatik basınca (60 mmHg) sahip bir yapıdır. Bu özel kapiller ağ, epitel hücreleriyle örtülüdür ve sıkıca sarılan glomerül Bowman kapsülü tarafından çevrelenmiştir. Filtrelenen sıvı, öncelikle Bowman kapsülünün içine, ardından proksimal tübül içine yönlendirilir. Bu noktadan itibaren sıvı, henle kıvrımına doğru ilerler; henlenin inen ve çıkan kolları aracılığıyla sıvı, kortekse ve medullaya yönlendirilir. Henle kıvrımının çıkan kolunun sonundaki özelleşmiş epitel hücreleri ile oluşan bölgeye "makula densa" adı verilir (Şekil 2.4). Bu yapı, böbrek fonksiyonlarının özenle düzenlendiği filtreleme ve idrar oluşturma süreçlerinde hayati bir rol oynamaktadır (21)

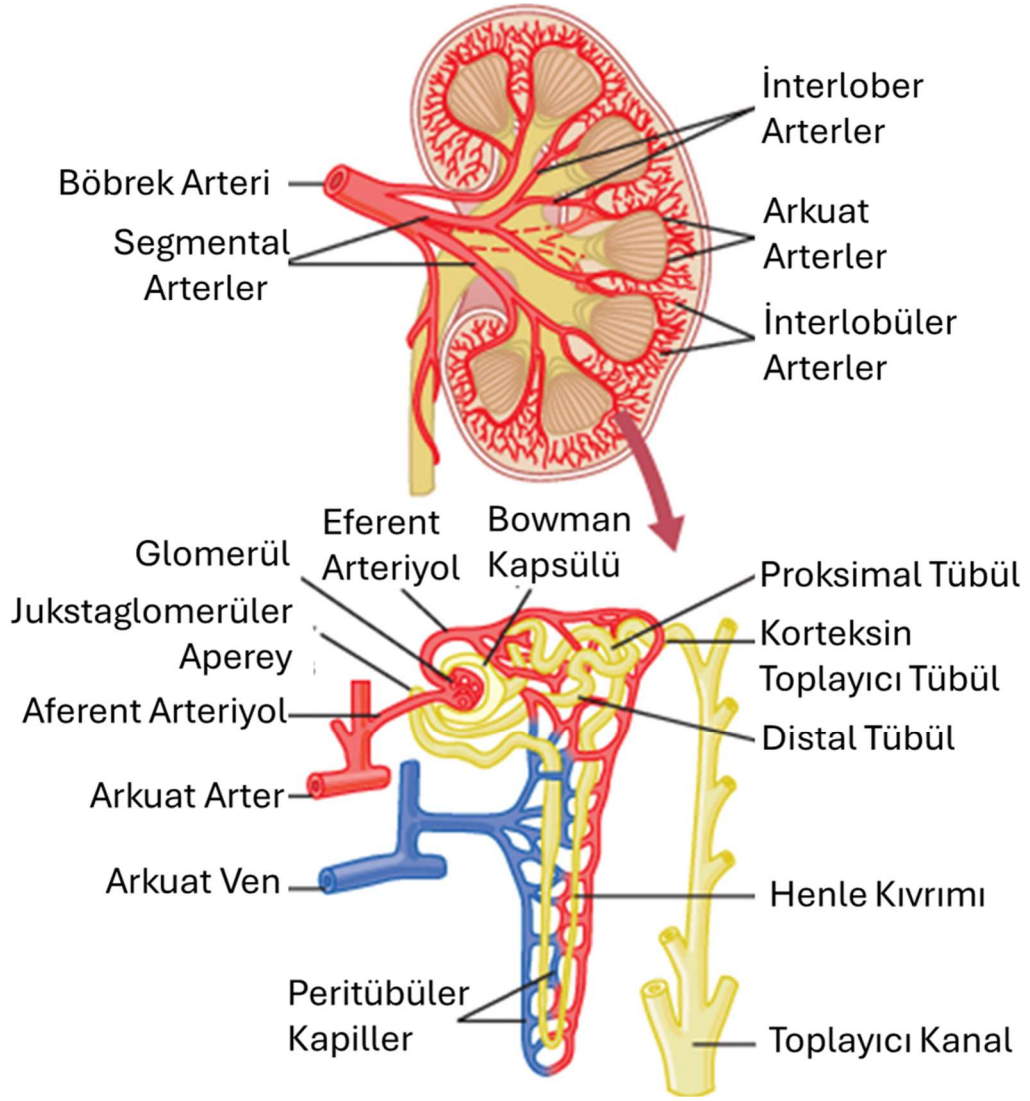


Şekil 2. 4. Makula densa yapısı (21)

2.1.2. Böbreğin Kanlanması

Böbreğin kan akımı, genellikle kalp debisinin yaklaşık %22'sini oluşturur ve dakikada 1100 ml civarındadır. Böbrek arteri, hilum bölgesinden girer ve ardından interlober, arkuat, interlobüler (radyal) arterler ve afferent arteriyollere dallanır. Afferent arteriyoller, glomerül kapillerlerini oluşturarak, plazma proteinleri dışında su ve diğer maddelerin yoğun bir şekilde filtre edildiği noktayı temsil eder. Bu, idrar oluşumunun başlangıç noktasıdır (Şekil 2.5.).

Böbrekteki kan dolaşımı, iki farklı kapiler yatağı içeren özel bir dolaşım sistemini kapsar. Glomerül kapillerlerinin distal ucu, efferent arteriyol ile birleşerek, peritübüler kapillerler adı verilen ikinci bir kapiller ağı oluşturur. Bu kompleks düzenleme, böbreğin görevlerini etkili bir şekilde yerine getirebilmesi için kan akımını hassas bir şekilde düzenlenmesini sağlar (21).



Şekil 2. 5. Böbreğin kanlanması (21)

2.2. Böbrek Fonksiyonları

Böbrekler, vücutta gerçekleşen metabolik süreçlerin bir yan ürünü olarak oluşan atıkları temizleme görevini üstlenen hayati organlardır. Aynı zamanda, vücut sıvılarının hacmi ve bileşimini kontrol etme fonksiyonunu da yerine getirirler. Böbrekler, plazmayı süzerek oluşan filtrattan vücudun ihtiyacına uygun maddeleri geri emer ve bu süreç sayesinde vücut için önemli olan maddelerin kana geri verilmesini sağlarken, istenmeyen zararlı maddeleri ise idrar yoluyla atar.

Bununla birlikte, böbreklerin sadece atık temizleme işlevi yoktur; aynı zamanda bir dizi önemli regülatör işlevi de vardır. Bu fonksiyonlardan bazıları şunlardır:

1. **Asit-Baz Denge Düzenlemesi:** Böbrekler, vücuttaki asit-baz dengesini düzenleyerek pH seviyelerini optimal bir dengede tutar.
2. **Eritrosit Yapımının Düzenlenmesi:** Eritropoetin salgılayarak, eritrositlerin üretimini düzenler.
3. **Arteriyel Kan Basıncının Düzenlenmesi:** Böbrekler, kan basıncını kontrol ederek vücuttaki dolaşımın stabilitesini sağlar.
4. **Hormon Salgılanması ve Metabolizma:** Böbrekler, bazı hormonların üretimine katkıda bulunur ve bu hormonları metabolize ederek atar.
5. **Glikoneogenez:** Uzun süreli açlık durumlarında, böbrekler aminoasitlerden glikoz sentezleyerek enerji üretimine katkıda bulunur (23).

2.3. Böbrek Fonksiyonunu Değerlendirmede Kullanılan Kavramlar

2.3.1. Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR)

GFR birim zamanda glomerülden Bowman kapsülüne süzülen sıvı miktarını ifade eder. Bu parametre, böbreğin klinik durumunu gösterir ve böbrek hastalığı gibi durumlarda hastalık sürecini yönlendirmede önemli bir ölçüdür. GFR genellikle miyositlerin metabolizması sonucu ortaya çıkan bir biomarker olan kreatinininden türetilir. Normal böbrek fonksiyonlarında, kreatinin kandan süzülerek idrar yoluyla atılır. Ancak, böbrek fonksiyonları bozulduğunda, serum kreatinin düzeyinde artış görülür. GFR'nin tahmini için 24 saatlik idrardaki kreatinin miktarı ve inulin klirensi testi gibi yöntemler kullanılır. Bu yöntemler, böbrek fonksiyonlarını daha detaylı bir şekilde değerlendirmek adına kapsamlı bir perspektif sunar. 24 saatlik idrar sürecinde atılan kreatinin miktarı ve inulin klirensi testiyle belirlenen özel bir maddenin böbrekler tarafından temizlenme hızı gibi faktörler, GFR'nin daha derinlemesine incelenmesine olanak tanır. Bu kompleks analizler, böbrek fonksiyonlarındaki değişiklikleri tespit etmek ve anlamak için daha sofistike bir değerlendirme sağlar (24).

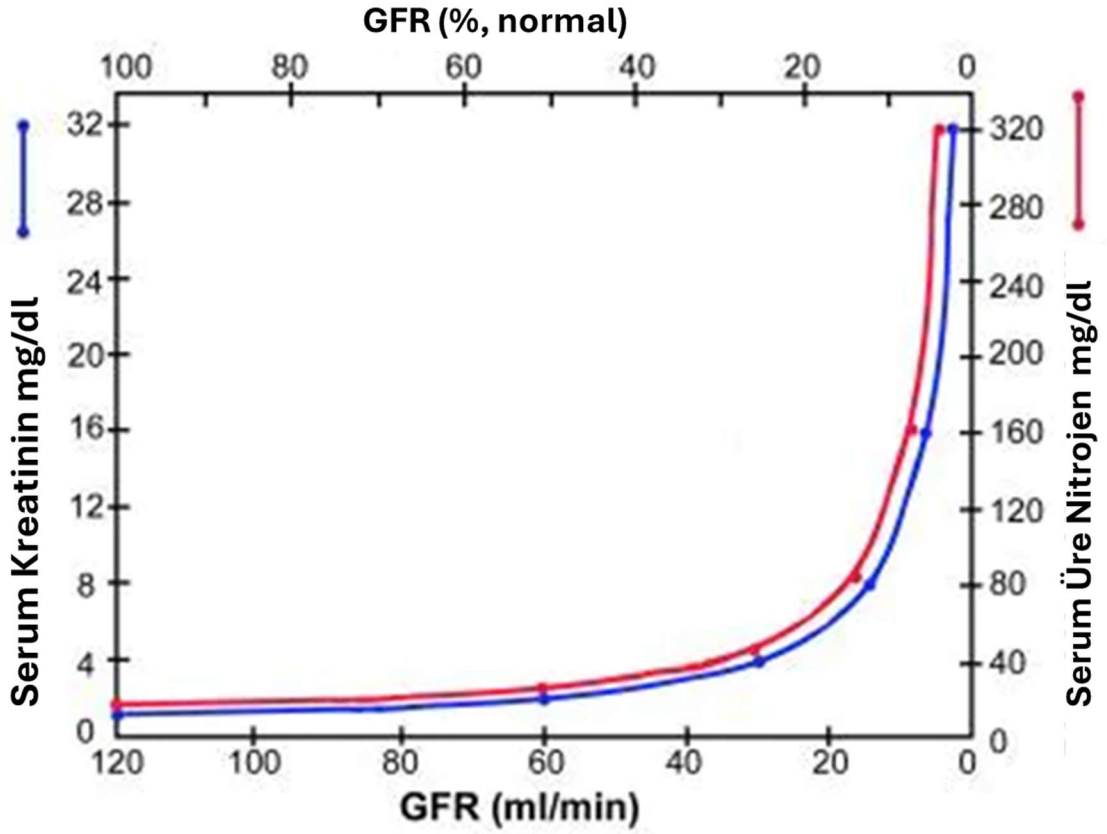
2.3.2. Üre

Üre, protein metabolizması sonucu karaciğerde sentezlenen ve amonyaktan türetilen 60 dalton molekül ağırlığına sahip bir metabolittir. Bu organik bileşenin klinik ölçümü, kan üre azotu değerini belirlemek amacıyla, üre içindeki nitrojenin laboratuvar ortamında ölçülmesiyle gerçekleşir. Karaciğerin üre sentezi, protein metabolizmasının sonucu olarak gerçekleşir ve bu süreç, BUN seviyelerindeki değişiklikleri yansıtan bir

indikatör olarak kullanılır. Böbreklerdeki tübüler reabsorbsiyon, ürenin kan dolaşımındaki seviyelerinde fonksiyonel değişikliklere neden olabilir. Ancak, böbrek fonksiyonlarında herhangi bir bozukluk olmadan, kandaki BUN seviyelerinde değişimler gözlemlenebilir. Örneğin, protein alımının artışı veya gastrointestinal sistemde hastalıkları, kandaki BUN seviyelerinin yükselmesine yol açabilir. Protein eksikliğine sebep olan hastalıklar ve karaciğer yetmezliği gibi patolojik koşullarda kandaki BUN seviyelerinin azalmasına neden olur. Bu durumlarda, karaciğerin üre sentez kapasitesi etkilenir ve BUN seviyesi azalır. Serumdaki BUN'un referans aralığı 5-20 mg/dl veya 1.8-7.1 mmol olarak kabul edilir (25).

2.3.3. Serum Kreatinin

Kreatininin üretimi kas hücrelerinde kreatin'in, kreatinin kinaz enzimi tarafından enzimatik olmayan bir şekilde anhidrasyonu ile gerçekleşir (26). Kas yıkımı sonucunda kan dolaşımına geçen kreatininin, eliminasyonu böbrekler tarafından yapılır. Kreatinin düşük moleküler ağırlığa sahiptir ve albümine bağlı değildir. Bu özellik, kreatinin glomerüllerden serbestçe süzülmesine ve renal filtrasyon sırasında engellenmeden geçişine olanak tanır (27). Kreatininin düşük moleküler ağırlığı, GFR belirlenmesinde önemli bir faktördür. Serbest formdaki kreatinin, böbreklerin ultrafiltrasyon sürecinden etkili bir şekilde geçer ve idrar yoluyla atılır. Günlük üretilen kreatinin miktarı kas kütesine bağlıdır. Bu nedenle, erkek ve kadınlar arasında kreatinin aralıklarında farklılık vardır; çocuklarda ve kas kütesi azalmış olanlarda kreatinin değerleri daha düşüktür. Diyet de kreatinin değerlerini etkiler. Kreatinin, kırmızı et alımından sonra %30'a kadar değişebilir. Gebelikte GFR arttığından, daha düşük kreatinin değerleri bulunur. Ayrıca, serum kreatinin değeri böbrek yetmezliğinin geç bir göstergesidir; serum kreatinin değerinde bir artış gözlenmeden önce böbrek fonksiyonu %50 oranında azalabilir (25).



Şekil 2. 6. GFR oranına göre serum kreatinin ve BUN düzeyleri.

2.4. Akut Böbrek Hasarı

ABH, glomerüler filtrasyon hızında ani (saatler ila günler içinde) düşüş olarak tanımlanır (28). ABH, dünya çapında yaygın bir hastalıktır ve her yıl yaklaşık 13 milyondan fazla insanı etkiler (29). ABH etkili bir tedavi veya önleyici yöntem olmaksızın kritik bir sorun olmaya devam etmektedir. ABH yoğun bakım ünitesindeki hastaların neredeyse %50'sini etkilemektedir (30). Diyaliz gerektiren ABH hastalarında ise mortalite oranı oldukça yüksektir (>%50) (31). Epidemiyolojik çalışmalar, ABH'nin sıklıkla kronik böbrek hastalığına dönüştüğünü ve son dönem böbrek hastalığı için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (32). Amerika Birleşik Devletleri'nde ABH ile ilgili tahmini yatan hasta maliyeti yıllık 10 milyar dolardan fazladır (33). Yapılan çalışmalar ABH'nin görülen en sık nedeni olarak iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarını göstermektedir (34). Bu hasarın patofizyolojik süreci oldukça kompleks olmasına rağmen, elde edilen kanıtlar oksidatif stresin renal I/R patolojisinde kritik bir rol oynayarak apoptoz ve inflamasyon gibi birçok yıkıcı kaskadı aktive ettiğini ortaya koymaktadır (35).

2.4.1. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı

2.4.2. İskemi Hasarı

I/R hasarının altında yatan patolojik süreç oldukça karmaşıktır. İskemi sırasında doku perfüzyonun kesilmesi ile hücre metabolizması aerobikten anaerobiğe değişir. Böylece hücre içi adenosin trifosfat (ATP) sentezi azalır (36). ATP'nin azalması, hücre içinde bir dizi sistemi etkiler. Hücredeki ATP azalması, hücre zarındaki $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPaz}$ pompasının aktivitesini azaltarak, hücre içinde Na^+ ve Ca^{+2} birikimine sebep olur. İyonların artışı suyu hücreye çekerek hücresel şişmeye neden olur (37, 38). İskemi durumunda, sitoplazmadaki Ca^{+2} konsantrasyonunun artışı bir dizi enzimi aktive eder. Bu enzimler arasında ATPaz'lar, proteazlar, endonükleazlar ve fosfolipazlar bulunur. Özellikle, fosfolipaz A2'nin aktivasyonu, hücre membranındaki fosfolipit yapısının bozulmasına yol açarak membran hasarını artırır. İskemi sırasında, hücrelerde ATP sentezi durmaktadır ancak hücre içi metabolik süreçler devam etmektedir. Bu süreçte, ATP sırasıyla ADP, AMP ve adenosin'e dönüşür. Adenosin, hücre dışına çıkarak inozin ve hipoksantine dönüşür. Normal koşullarda, hipoksantin, ksantin dehidrogenaz aracılığıyla ksantin ve ürik aside doğru metabolik dönüşümden geçer (36-41).

Hücre içindeki Ca^{+2} seviyelerindeki artış aynı zamanda ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaz'a dönüşümüne yol açar. Reperfüzyon başladığında, hipoksantin'in ksantine ve ksantin ürik aside dönüşümü ksantin oksidaz tarafından gerçekleştirilir. Bu reaksiyonda moleküler oksijen elektron alıcısı olarak kullanılır ve süperoksit radikalleri oluşur (39, 40). Uzun süreli iskemi durumunda ise hücrelerde bir dizi patolojik değişiklik ortaya çıkar. Bu değişiklikler arasında mitokondride vakolizasyon (bozulma), lizozomda şişme, plazma zarında yüksek düzeyde hasar ve hücre matriksinde kalsiyumca zengin, yoğun ve şekilsiz içerik birikimi gibi hücresel hasarlar görülür (41).

2.4.3. Reperfüzyon Hasarı

Reperfüzyon, iskemik dokuya kan akımının yeniden sağlanması anlamına gelir ve bu süreç, dokunun oksijenlenmesini içerir. İskeminin sona ermesiyle dokunun yeniden reperüze olması paradoksal olarak iskemik döneme kıyasla daha fazla doku hasarına yol açabilen bir sürecin başlamasına neden olur. Reperfüzyon sonrası oksijen akımı iskemik dokuda ROS oluşumunun artışına yol açar (42, 43).

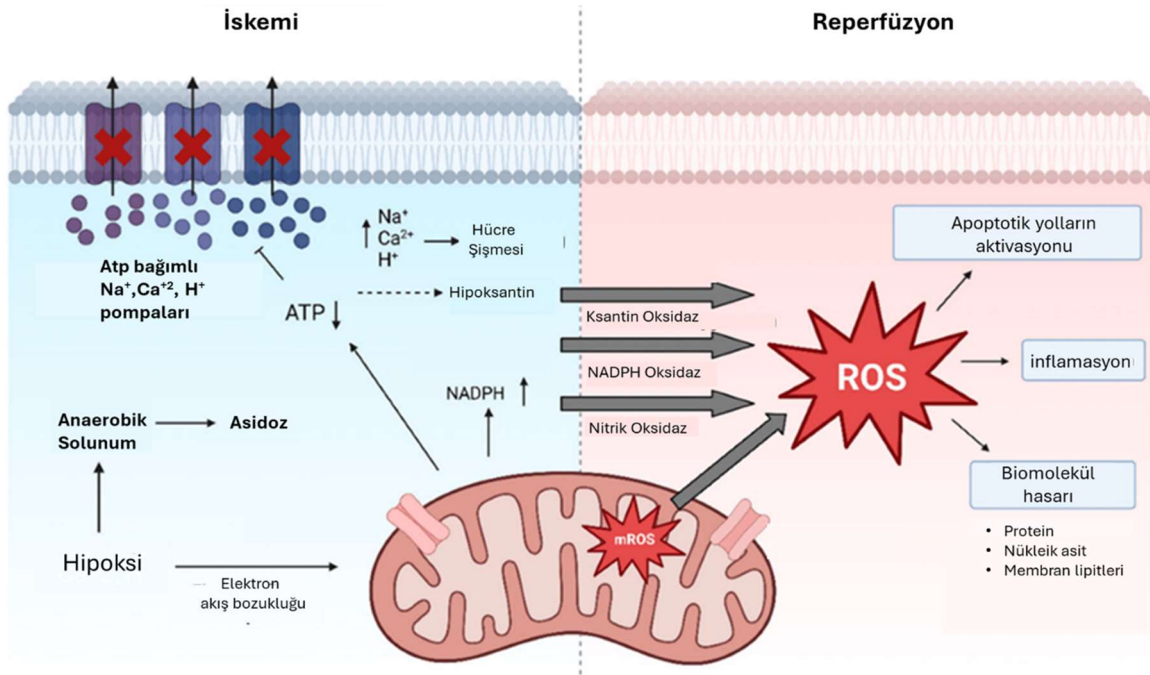
ROS, esas olarak endojen biyolojik sistemlerde NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri yoluyla olan serbest radikallerden üretilir. I/R,

dokularda oksidatif strese neden olarak ROS gibi serbest radikallerinin üretimi yoluyla hasara yol açmaktadır. Artan ROS hücrel yıkıma neden olarak lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit salınımına yol açar (44). Hücrel protein, lipitler ve nükleik özellikle deoksiribonükleik asit (DNA) molekülleri, reperfüzyon hasarına karşı en fazla duyarlılık gösteren hücrel yapılar arasında yer almaktadır (39).

Hücreler ROS'un neden olduğu hasara karşı glutatyon peroksidaz (GSHx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz gibi endojen antioksidan enzimler salgılar (45). I/R sırasında antioksidanların hasara karşı koyma kabiliyeti azalır. I/R sonucu oksidan antioksidan dengenin kaybolması ve DNA hasarının meydana gelmesi apoptotik süreci başlatabilir (46). Apoptozisin düzenlenmesi ile ilgili en önemli genler Bax, Bcl-2 proteinleri ve kaspazlardır (47). Apoptozun renal I/R hasarının patolojik süreciyle yakından ilişkili olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur (48). Renal hasarından sonra meydana gelen apoptozis, mitokondriyal apoptoz yoluna dayanır, apoptozu teşvik eden transmembran proteinler mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitoplazmaya salınır ve DNA parçalanmasına ve apoptotik değişikliklerine neden olan bir dizi "kaspaz"ı aktive ederek apoptozom oluşumuna neden olur (49, 50). Apoptozom oluşumu, kaspaz-9'un otokatalitik aktivasyonuna neden olur, sırayla cellat olarak tabir edilen kaspazların (kaspaz-3 gibi) proteolitik aktivasyonunu teşvik eder ve böylece programlanmış hücre ölümünün geri dönüşümsüz fazını başlatır (51). Bu süreçte Bcl-2 (anti-apoptotik protein), mitokondriyal membranı stabilize eder ve transmembran proteinleri salınımını önleyerek apoptozu inhibe ederken, Bax (pro-apoptotik protein) dış mitokondriyal dış zarın geçirgenliğini artırarak apoptotik yolun tetiklenmesinde rol alır (52).

Tüm bunların yanı sıra inflamasyon da mevcut süreçte önemli rol oynayarak iskemik sürecin daha da kötüleşmesine yol açar (53). Renal I/R'yi takiben; ROS oluşumu ile nekrotik hücrelerin artışı inflamatuvar yanıtı tetikler ve bunun sonucunda proinflamatuvar sitokinlerin aktive olacağı bir dizi kaskadı başlatır (54). Aktive makrofajlar renal hasarı takiben aktive olur. Bu aktive hücreler, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-6 (IL-6) gibi büyük miktarlarda inflamatuvar sitokinleri serbest bırakır. Bunlarda nötrofillerin, monositlerin ve T hücrelerinin hasarlı bölgeye sızması yoluyla inflamasyonu güçlendirebilir (55). Nod benzeri reseptör proteini 3 (NLRP3) inflamazomları, nod benzeri reseptör ailesinin en iyi karakterize edilmiş bir üyesidir, NLRP3'ün inflamatuvar yanıtı, caspase-1 aktivasyonu yoluyla IL-1 β ve interlökin-18 (IL-18) salınımını tetikleyerek I/R hasarında önemli roller oynar (56). Renal hücrelerdeki I/R hasarında ROS açıklandığı üzere birçok yıkıcı kaskadı harekete

geçirmektedir. I/R hasarındaki ROS'un meydana getirdiği biyokimyasal mekanizmaları anlamak sürece müdahale etmeyi önemli kılabılır (57).



Şekil 2. 7. İskemi-reperfüzyonun dokuda neden olduğu hasarın etkileri (58).

2.5. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri

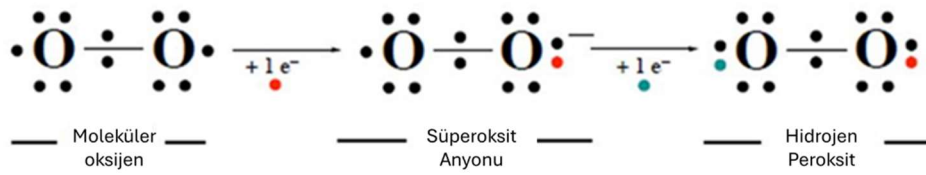
ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS), canlı organizmalar için gerekli olan oksijen metabolizmasının toksik yan ürünleri olarak üretilir. Bu serbest radikaller süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit ($NO^{\cdot}$), hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), singlet oksijen (1O_2) ve lipid peroksil radikallerinden ($LOO^{\cdot}$) oluşur. Reaktif oksijen türleri, bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron bulunduran yüksek reaktif özelliklere sahip moleküllerdir. Kimyasal olarak dengesiz bir yapıya sahip olan reaktif oksijen radikalleri, orbitallerindeki elektronlarını eşleştirmek amacıyla atomlar veya moleküllerle etkileşime girerek istikrarlı bir konfigürasyona ulaşma eğilimindedirler (59, 60).

2.5.1. Süperoksit Radikali

Aerobik hücrelerin büyük bir çoğunluğunda, oksijenin bir elektron alması akabinde redüklenerek serbest süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir. Süperoksit, serbest radikal olmanın yanı sıra doğrudan zarar verici bir etkiye sahip değildir; esasen önemli olan özelliği, hidrojen peroksit oluşturma kabiliyeti ve geçiş metalleri iyonlarını indirgeyici bir rol oynamasıdır (61, 62).

2.5.2. Hidrojen Peroksit

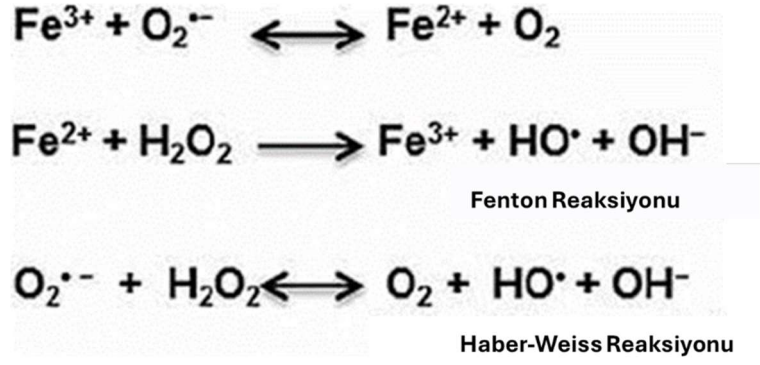
Oksijenin çevresindeki bir molekülden 2 elektron alması veya süperoksidin bir elektron alarak peroksit oluşturur. Peroksit molekülü ise iki hidrojen atomu ile bir araya gelerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir. H_2O_2 , kendisi serbest radikal olmasa da reaktif oksijen çeşitleri arasında yer alır ve meydana gelen hücresel hasarda kilit bir rolü üstlenir. Süperoksit ile reaksiyonu sonucunda, en reaktif ve zarar verici olan hidroksil radikalini meydana getirir. Bu kimyasal süreç, hücresel düzeyde çeşitli biyolojik etkileşimlere neden olabilir, bu da hücresel homeostazın bozulmasında kritik bir rol oynar (63, 64).



Şekil 2. 8. Hidrojen peroksit oluşumu (63, 64)

2.5.3. Hidroksil Radikali

Belirli bir geçiş elementinin varlığında hidrojen peroksitin indirgenmesi, hidroksil radikali ($OH^\cdot$) oluşumunu başlatır (64). Bu radikal, son derece reaktif bir oksijen türüdür ve bulunduğu bölgede ciddi hasarlara yol açabilir. Özellikle tiyoller ve yağ asitleri gibi moleküllerden bir hidrojen atomu alarak yeni radikallerin oluşumunu tetikleyebilir (63). Glutasyon ve endojen antioksidan enzim düzeyleri belirli bir eşiğin altındaysa, süperoksit ve hidrojen peroksitin, hücrede serbest halde bulunan demir ve bakır iyonları ile reaksiyona girmesi kaçınılmazdır. Bu reaksiyon sonucunda ise çok güçlü bir reaktif olan hidroksil iyonu meydana gelir. Bu durum, hücresel düzeyde karmaşık biyolojik etkileşimlere ve oksidatif stresin artmasına neden olur (67).



Şekil 2. 9. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidroksil oluşması

2.5.4. Singlet Oksijen

Oksijen atomunun orbitasındaki bir elektronun enerji alarak yer değiştirmesi, Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) türünün oluşumunu tetikler. Bu tür, özellikle proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın doğrudan okside edilme yeteneği ile dikkat çeker. Bu özellik, biyolojik yapı çeşitli biyomoleküllerle karmaşık etkileşimlere olanak tanır (69, 70).

2.5.5. Nitrik Oksit

$\text{NO}^{\bullet}$, normal koşullar altında endotelyal ve nöronal nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından sentezlenen kardiyovasküler ve renal fonksiyonların önemli bir düzenleyicisidir. NO ve diğer reaktif nitrojen türlerinin aşırı üretimi, hücre hasarına ve sinyalizasyonda değişikliklere yol açabilir. Oksidan ve inflamatuvar durumlarda, büyük miktarda NO üretilebilir. Ayrıca NOS, inflamatuvar sitokinler tarafından etkilenebilir. NO , ROS'a karşı son derece duyarlıdır ve diğer reaktif bileşikleri oluşturmak üzere birleşir. Bu süreç sonucunda, NO biyoyararlanımındaki azalma endotel disfonksiyonuna ve vazodilatasyon kaybına neden olabilir (71).

2.5.6. Peroksinitrit

$\text{ONOO}^{\bullet}$, NO ile $\text{O}_2^{\bullet-}$ arasındaki reaksiyon sonucu oluşan bir oksidan türüdür. Bu reaksiyonun, proteinlerde lipid peroksidasyonunu, metiyonin ve sülfhidril grubu oksidasyonunu, antioksidan tükenmesini ve DNA hasarını tetikler (72).

2.6. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Bileşenlerine Etkisi

I/R sürecinde, indirgenme reaksiyonlarına bağlı olarak meydana gelen ROS özellikle lipit peroksidasyonu gibi mekanizmalar aracılığıyla hücresel hasara neden olarak, I/R hasarında diğer birçok hasar kaskadını tetikleyerek primer bir rol oynar (73).

Bu sebeple serbest radikalleri oluşum ve detoksifiye mekanizmalarını anlamak hasar sürecini anlamayı kolaylaştıracaktır. ROS'lar inflamasyon, radyasyon, toksisite dışında aerobik metabolizmanın bir ürünü olarak da üretilmektedir (69). ROS, aerobik hücrelerin normal metabolizmasının bir yan ürünü olarak ortaya çıkabilir. Hücresel solunum ve enerji üretimi süreçlerinde oksijenin kullanılması sırasında (hücresel elektron taşıma sistemleri vb.), indirgenmiş oksijen türleri aracılığıyla ROS üretimi gerçekleşir. ROS, çeşitli patolojik durumlar ve dışsal etkilerle de ilişkilidir. İnflamasyon, radyasyon, I/R hasarı, hiperoksi (aşırı oksijen maruziyeti), ısı şoku belirli ilaçların kullanımı gibi etkenler, hücrelerdeki ROS üretimini artırabilir. Bu durumlar, oksidatif stresin artmasına ve serbest radikal hasarının potansiyel olarak yükselmesine katkıda bulunabilir. İskemi, reperfüzyon ve çeşitli patolojik koşullar, ROS üretimindeki artışın temelini oluşturan bu kaynakların etkileşimine dayanır (69, 74, 75).

ROS, kimyasal açıdan dış yörüngelerindeki eşleşmemiş elektron bulunduran reaktif moleküler varlıklar olarak da tanımlanabilir. Bu radikaller, elektron eksikliğinden kaynaklanan bir reaktiviteye sahip olup, çevrelerindeki moleküllerle etkileşime girdiklerinde biyokimyasal tepkimelere yol açarlar. Bu etkileşimler, organizmanın temel bileşenlerini oluşturan protein, lipid, karbonhidrat ve inorganik kimyasallar gibi moleküler yapılarla çeşitli biyokimyasal tepkimeleri tetikleyebilir. Serbest radikallerin reaktif özellikleri, enerji düzensizliklerine sebep olabilir. Bu düzensizlikler, hücre membranları ve nükleik asitler gibi kritik biyomoleküler yapıları etkileyebilir. Özellikle, serbest radikaller hücre içinde DNA ve lipid membranda hücre hasarına neden olabilirler. Bu tür moleküler etkileşimler, hücre fonksiyonların bozulmasına ve çeşitli patolojik durumların ortaya çıkmasına katkıda bulunabilir (76, 77).

2.6.1. Proteinlere Etkisi

Oksidatif hasar, biyolojik sistemlerdeki proteinlerin yapısını ve fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyen, hatta hücre ölümüne yol açabilen bir süreçtir. Bu etki, özellikle sülfür içeren amino asitler olan sistein ve metiyonin üzerinde belirginleşmektedir. Bu amino asitler, ROS gibi oksidatif moleküllerle etkileşime girebilmekte ve bu etkileşim sonucunda proteinlerin yapısal bütünlüğünde bozulmalar meydana gelebilmektedir.

Oksidatif hasar, bu amino asitlerin yanı sıra genel protein yapısını bozarak biyolojik aktivitelerini olumsuz etkileyebilir. Bu durum, hücre içindeki önemli protein fonksiyonlarının kaybına ve hatta hücre ölümüne neden olabilir. Oksidatif stresin bu

süreçte oynadığı kritik rol, hücrelerin normal fonksiyonlarını sürdürme yeteneklerini ciddi şekilde etkileyebilir (78, 79).

2.6.2. Lipitlere Etkisi

Hücre zarlarının yapısında bulunan lipitler, genellikle doymamış yağ asitleri (PUFA) şeklinde mevcuttur. Lipitler, serbest radikallerin oluşturduğu etkilere karşı diğer biyomoleküllere kıyasla daha duyarlıdır. Özellikle, PUFA'ların serbest radikallere maruz kalması lipid peroksidasyonuna yol açabilir (79, 80). Lipid peroksidasyonu, genel olarak, serbest radikaller veya radikal olmayan türler gibi oksidanların karbon-karbon çift bağları içeren lipitlere, özellikle de bir karbondan hidrojen çıkarılmasını içeren PUFA'lara saldırdığı bir süreçtir. Bu saldırı sonucunda lipid peroksil radikalleri ve hidroperoksitler oluşur (80). Reaksiyonun ilk aşaması, PUFA'ların metilen grubunun HO⁻ reaktifiyle tepkimeye girmesidir. Molekül içindeki çift bağın konfürmatif değişimi, dien konjugatlarının ortaya çıkmasına yol açar ve bu sürecin ardından ROS'ların lipit ile etkileşimi sonucunda LOO⁻ meydana gelir. LOO⁻ radikali, hücre membranındaki diğer PUFA'ları etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu tetikler. reaksiyonda ilk olarak PUFA'lardan ayrılan hidrojen molekülü, LOO⁻ ile tepkimeye girerek lipit hidroperoksitlere (LOOH) metabolize olur. Bu şekilde başlayan ve kendini tekrarlayan otokatalitik reaksiyonlarla devam eden süreç, lipit peroksidasyonunu destekler. Lipit peroksidasyonu, hücrelerde yıkıcı etkiler meydana getiren süreci başlatan bir mekanizmadır (80-82). Hücre membranındaki deformasyonlar, membranın permeabilitesinde bozulmaya, intraselüler iyon homeostazının bozulması sonucunda hücresel fonksiyonların akamete uğramasına sebep olur. LOOH, hücre içinde metabolizasyonu sonucu genellikle aldehitlere dönüşmektedir. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan MDA, bir aldehit türevidir. Bu kimyasal değişim, lipit peroksidasyonunun bir yan ürünü olarak kabul edilir ve biyolojik sistemlerde oksidatif stresin bir göstergesi olarak önem taşır. Bu aldehit türevi, hücre membranlarının lipit komponentlerine zarar vererek membran yapısında deformasyona neden olabilir, bu da hücre bütünlüğünü etkileyebilir. Ayrıca, enzim aktivitesinde ve iyon taşınımında bozulmalara yol açabilir, hücresel fonksiyonları olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, MDA'nın biyokimyasal etkileşimleri ve hücresel etkileri, oksidatif stresin biyolojik sistemlerdeki rolünü anlamak için önemli bir odak noktasını oluşturur (82-84).

2.6.3. DNA'ya Etkisi

ROS'lar, hücrelerde değişime ve hatta ölüme sebep olarak, DNA üzerinde hasara neden olabilmektedir. Bu etki, DNA'nın pirimidin ve pürindeki hasar ve yıkım sonucu DNA'nın denatürasyonuna yol açar. Oksidatif hasarın etkisiyle, baz çifti değişimleri gibi yeniden düzenlemeler ortaya çıkar ve DNA'nın yapısı değişir, bu da genetik mutasyonlara zemin hazırlar. DNA, ROS'un etkilerine karşı duyarlı bir hedef olup, bu moleküler düzeyde meydana gelen değişiklikler genellikle biyolojik sistemi derinden etkileyebilir (78, 85).

2.7. Antioksidan Sistemler

Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getiren veya oksijen radikalleri oluşumunu kısıtlayan maddelerdir (86). Bu maddeler, organizmada gerçekleşen anabolik ve katabolik olayları etkileyen, bir kısmı enzimlerin aktif gruplarında bulunan bileşenlerdir. Antioksidanların yetersizliği veya eksikliği durumunda, fizyolojik fonksiyonlarda önemli derecede azalma veya durma meydana gelebilir (87, 88).

Antioksidanlar, genellikle dört farklı mekanizma ile serbest radikallere etki ederler:

1. Serbest Radikal İnhibisyonu: Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirebilirler. Bu, radikal zincir reaksiyonlarını durdurarak oksidatif stresin önlenmesine katkıda bulunur.
2. Radikal Oluşumunu Engelleme: Antioksidanlar, hücre içinde veya hücre zarında serbest radikal oluşumunu engelleyerek hücrelerin korunmasına yardımcı olabilirler.
3. Detoksifikasyon: Antioksidanlar, serbest radikalleri zararsız hale getirerek onları detoksifiye edebilirler. Bu, radikallerin hücrelere zarar vermesini engeller.
4. Oksidatif Hasarı Onarma: Antioksidanlar, oksidatif hasara uğramış molekülleri onararak hücrelerin normal fonksiyonlarına geri dönmesini sağlayabilirler

Bu mekanizmalar, antioksidanların serbest radikallerle etkileşime geçerek hücrel hasarı önleme veya azaltma yeteneklerini açıklar (86-90).

2.7.1. Enzimatik Antioksidanlar

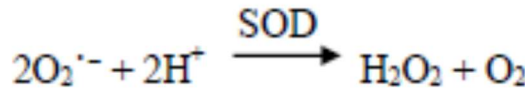
Vücuttaki oksidatif strese karşı ilk savunma hattı enzimatik aktiviteye sahip olan üç protein antioksidana (SOD, CAT ve GPx) odaklanılmıştır.

Süperoksit Dismutaz

SOD, yüksek reaktif süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevirme yeteneği ile öne çıkan, antioksidan savunmanın ilk hattını oluşturan kilit enzimlerden oluşan bir gruptur (91). Süperoksit dismutazın dört izozimini tanımlanmıştır:

- SOD1, bakır ve çinko iyonlarını sitozolde bağlayan bir metaloprotein olup, hücre içinde lokalize olmuştur.
- SOD2, mitokondride konumlanmış ve mangan veya demir iyonları ile ilişkilidir.
- SOD3, hücre dışında lokalize olup, bakır ve çinko ile ilişkilidir (92).
- SOD4 Streptomyces sınıfına ait çeşitli aerobik bakterilerde nikel ile ilişkilidir (93).

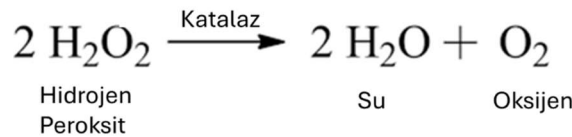
SOD1'in moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 32 kDa'dır. Süperoksit radikalini hidrojen peroksit'e dönüştürme görevinde, bu enzim grubu glutatyon peroksidaz ve katalaz ile işbirliği yapar.



Şekil 2. 10. SOD etki mekanizması

Katalaz

CAT, esas olarak peroksizomlarda bulunan tetramerik porfirin içeren bir enzimdir. H_2O_2 'nin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder (94).



Şekil 2. 11. CAT Etki Mekanizması

Diğer antioksidan enzimlerle birlikte katalaz, çeşitli organlarda oksidatif stresin biyobelirteçleri olarak kabul edilmiştir; örneğin, I/R ile indüklenen ABH'si olan sıçanlarda, bu enzimlerin renal seviyesi önemli ölçüde azalır, ancak çeşitli bitkilerle tedavi bu durumu düzeltebilir (95).

Glutasyon peroksidaz

Bu enzim, iki farklı şekilde mevcut olabilir: selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız, her biri farklı alt birimlere ve farklı aktif bölgelere sahiptir (96). GSHx, H₂O₂ veya organik peroksitin (ROOH) su veya alkole indirgenmesini katalize eder (97); bu süreç, bu reaksiyon sırasında GSH'nin (indirgenmiş glutasyon) oksitlenmiş GSSG'ye (oksitlenmiş glutasyon) dönüştüğü bir ortamda gerçekleşir. Bu reaksiyon, enzimin hücre zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin korunmasında özel bir öneme sahip olduğu, hücre içindeki çok bileşenli antioksidan savunma sisteminin bir parçası olarak işlev gördüğü anlamına gelir (98). İnsanlarda dört izoformu bulunmaktadır: sitozolik ve mitokondriyal (GSHx1), sitozolik (GSHx2), ekstraselüler (GSHx3) ve fosfolipid peroksit (GSHx4) (99). Bu izoformların en yüksek miktarı böbrek ve karaciğerde bulunmaktadır (100). H₂O₂ için GPx ve CAT arasında bir rekabetin olduğu bilinmektedir (77).

2.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutasyon

GSH (L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine), çoğu hücre tipinde protein olmayan bir tiyol olup, milimolar konsantrasyonlara ulaşabilir. GSH, hücre içinde özellikle mitokondri, nükleus ve sitozol bölgelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. İndirgenmiş formu (101), biyolojik açıdan aktif bir moleküldür. GSH, peroksidazlar ve GSH-S-transferazlar gibi detoksifikasyon enzimlerinde bulunarak ROS/RNS'ye karşı antioksidan bir savunma fonksiyonu icra eder (102, 103).

Koenzim Q

Koenzim Q (CoQ), mitokondriyal solunum zinciri ve diğer iç membranlarda lokalize olan bir benzokinon türevidir. CoQ, solunum zincirinde elektron taşıyarak oksidatif fosforilasyon ile enerji iletimini sağlar ve aerobik adenozin trifosfat (ATP) üretimine doğrudan katkıda bulunur (104). Bu bileşik, tüm membranlarda bulunan, endojen olarak sentezlenen lipid çözünür bir antioksidan olarak tanımlanır. Koruyucu etkisi, özellikle oksidatif hücresel olaylara yakın lokalizasyonu sayesinde lipitlerden, proteinlere ve DNA'ya kadar geniş bir yelpazede görülür (105).

C Vitamini

Askorbik asit olarak da bilinen C Vitamini, , bitkilerde yaygın olarak bulunan ve suda çözünen bir vitamin grubuna ait bir bileşiktir. Özellikle semihidroaskorbat radikal ara ürünü aracılığıyla dehidroaskorbik aside okside olabilme kapasitesiyle dikkat çeker. Bu bileşik, özellikle hidroksil radikali ve süperoksit gibi serbest radikallerle hızlı bir reaksiyona girmeye yatkındır ve bu reaktiflerin temizlenmesinde etkin bir rol oynar (106, 107).

E Vitamini

Dışarıdan alınması gereken, bu esansiyel antioksidan insan vücudunda kritik bir role sahiptir. Doymamış yağ asitlerinin korunması, özellikle de hücre membranının fonksiyonu ve yapısı açısından önem arz eder. Ayrıca serbest radikallerin membranlarda meydana getirebileceği potansiyel lipid peroksidasyonunu önleme yeteneğine sahiptir. Bu etkisini zincir kırıcı bir işlevi üstlenerek reaktif oksijen türlerini temizleme konusunda membranlardaki temel bir aracı olarak gösterir. Ayrıca, membran fosfolipitlerine kolayca difüze olabilir, bileşikleri doymamış yağ asitlerine indirgeyebilir (108, 109).

2.8. Böbrek Hasar Belirteçleri

BUN ve Kreatinin dışında böbrek hasarının değerlendirilmesinde spesifik yeni biyobelirteçler tanımlanmıştır. Bu biyobelirteçler, hasarın ilerlemesini erken aşamada tespit etme ve böylece önleyici stratejilerin daha erken uygulanmasına katkı sağlama potansiyeli taşımaktadır (110). Ancak kreatinin ve BUN, böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için geleneksel bir belirteç olmasına rağmen, KIM-1 ve NGAL gibi belirteçler, özellikle böbrek tübüler hücrelerindeki hasarı daha hassas bir şekilde yansıtarak, ABH'nin erken aşamalarda tespitini mümkün kılar. Bu biyobelirteçlerin klinik uygulama ve değerlendirme süreçleri devam etse de, böbrek hasarının daha hızlı ve etkili bir şekilde belirlenmesinde önemli bir parametre olarak öne çıkmaktadır (111).

2.8.1. Nötrofil Jelatinaz ile İlişkili Lipokalin

İnsan nötrofil jelatinaz-ilişkili lipokalin (112), 25 kDa moleküler ağırlığa sahip polipeptit yapıda aktif nötrofillerin salgı proteinidir. NGAL, kemik iliğindeki olgunlaşma sürecinde sırasında nötrofillerin granülleri içinde lokalize olur (113, 114). Yapılan araştırmalar, NGAL'in doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir bileşeni olduğunu göstermektedir. İnsan NGAL'i, çeşitli maddelerin taşınmasında rol oynayan lipokalin-2

olarak tanımlanan bir protein ailesinin bir üyesidir (115). NGAL'in birincil rolü demirin biyolojik aktivitesini düzenlemektir. NGAL hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime girer ve hücre içine demiri serbest bırakır (116). Öte yandan, demire bağlı olmayan formdaki NGAL, hücre yüzey reseptörleriyle etkileşime girer ve hücre içi demiri şelatlayarak hücre dışına çıkarır. Bu nedenle NGAL, insanlarda ve hayvanlarda demir homeostazının kritik bir düzenleyicisidir (116).

NGAL, birçok dokuda, özellikle de böbrek, kalp, karaciğer ve akciğerlerde, eksprese edilmektedir (117). Plazma ve idrar NGAL konsantrasyonları genellikle çok düşük seviyelerdedir ve genellikle tespit edilemezler (118). Hayvan çalışmaları, NGAL'in yaralanmış böbrekte yüksek oranda yukarı regüle edilen genlerden biri olduğunu ortaya koymuştur (112). İlk olarak da Mishra ve ark. deneysel ve klinik çalışmalarla NGAL'in ABH'nin erken bir biyobelirteci olabileceğini öne sürmüştür (119, 120). NGAL, ABH'den sonraki iki saat içinde plazmada tespit edilebilir ve 6 saat sonra konsantrasyonu zirveye ulaşır (121). Bununla beraber ABH'ye bağlı serum ve idrar NGAL yüksekliği, kreatinin artışından 24 saat önce gözlenmiştir (120, 122). Ayrıca ABH'de plazma NGAL'in idrar NGAL'e ve idrar NGAL'in plazma NGAL'e üstünlüğü bulunmamıştır (123).

2.8.2. Kidney Injury Marker-1

Böbrek hasarı molekülü 1 (KIM-1), bir proksimal tübül apikal transmembran proteinidir. Hücre dışı bileşeni O-glikozillenmiş müsin ve 6-sistein alanlarını (ikincisi immünoglobulinlere benzeyen bir yapıya sahiptir) içerir (124). Bu molekül, ABH durumlarının erken tespiti için potansiyel bir biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir (125). KIM-1, böbrek hastalıklarında, iskemi, nefrotoksik ilaçlar, kronik böbrek hastalığı ve akut/kronik böbrek nakli disfonksiyonu gibi çeşitli durumlarda yukarı eksprese edilir. Molekülün birkaç özelliği, böbrek hasarı için ideal bir biyobelirteç olmasını desteklemektedir. Örneğin, KIM-1 normal böbrekte eksprese edilmez, ancak hasarlı proksimal tübüler hücrelerde spesifik olarak eksprese edilir ve böyle bir ekspresyon hasarlı hücreler tamamen iyileşene kadar devam edebilir. Ayrıca, ektodomainin böbrek tübüllerinin lümenlerine hızlı ve entegre bölünmesi, KIM-1'in idrarda tespit edilebilir hale gelmesini sağlar (126).

KIM-1 ekspresyonu glomerülde, peritübüler interstisyel hücrelerde veya iç medüller hücrelerde yoktur (124, 127). İdrar KIM-1 seviyesi, doku KIM-1 ile sıkı bir ilişki içindedir ve böbrek hasarının ciddiyeti ile korelasyon gösterir. Bu nedenle, idrar

KIM-1 seviyelerinin ölçümü, böbrek hasarının değerlendirilmesi ve tedavi etkilerinin non-invaziv ve hassas bir şekilde izlenmesi için umut verici bir yöntem olabilir (128). Nefrotoksisite çalışmalarında, idrar KIM-1 seviyelerinin kan üre nitrojeni ve plazma kreatinin artışlarından daha önce ciddi şekilde arttığı gözlemlenmiştir (129). Benzer sonuçlar, I/R hasarı modelinde de elde edilmiştir; 10 dakikalık I/R hasarı, plazma kreatininde, kreatinin klirensinde veya proteinüride herhangi bir değişiklik olmaksızın idrar KIM-1'inde önemli bir artışa neden olmuştur (127, 130). Ayrıca yapılan çalışmalarda sağlıklı sıçanların böbreklerinde KIM-1 düşük düzeyde eksprese edilmektedir; ancak I/R kaynaklı hasar durumlarında, bu molekülün böbreklerde belirgin şekilde arttığı literatürde rapor edilmiştir (124). Transplant biyopsilerinde, KIM-1 ekspresyonunun histolojik inceleme ile tespit edilemeyen erken tübüler tanıları koyabildiği ve KIM-1'in ayrıca akut tübüler nekrozu diğer allograft disfonksiyonundan ayırt etmeye yardımcı olduğu rapor edilmiştir (131).

KIM-1'in önemli bir özelliği, hücre dışı alanlarının yaralanma durumlarında hücre yüzeyinden ayrılması ve idrara karışmasıdır. Normal böbreklerde KIM-1 ekspresyonu düşük seviyelerde bulunurken, ABH durumlarında özellikle proksimal tübül hücrelerinde bu ekspresyonun önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, böbrek hasarının hızlı bir şekilde tespit edilmesini ve izlenmesini sağlar, zira KIM-1 konsantrasyonu yaralanmayı takip eden saatler içinde belirgin bir şekilde artar. Bu bağlamda, KIM-1'in ölçümü, ABH'nin erken tespiti ve takibi için umut verici bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir (132).

2.8.3. Cystatin C

Cystatin C, glomerüler filtrasyonun biyobelirleyicisi olarak işlev gören nonglikozile bir proteindir. Moleküler büyüklüğü 13 kDa olan bu protein (133), yaklaşık %99 oranında glomerüler filtrasyon yoluyla kandan süzülür ve geri emilim olmadan dolaşımdan uzaklaştırılır (134, 135). Cystatin C, tüm insan çekirdekli hücreler tarafından sentezlenir ve serum düzeylerinin, glomerüler filtrasyon hızı dışındaki patofizyolojik durumlarla anlamlı bir ilişki göstermemesi nedeniyle housekeeping tipi bir gen olarak değerlendirilir.(136). ABH durumlarında, Cystatin C'nin kreatinden daha etkili bir performans sergilediği ve bazı durumlarda böbrek yetmezliğini daha erken belirleme potansiyeli taşıdığı belirtilmiştir. Bu sebeple, Cystatin C'nin ABH'nin erken tespiti konusunda önemli bir avantaj sunabileceği düşünülmektedir (137).

2.8.4. Interleukin 18

İnterlökin-18 (IL-18), IL-1 süper ailesine ait bir sitokin olarak tanımlanmaktadır (138). IL-18, özellikle akut böbrek hasarı durumlarında immün sistemde önemli bir rol oynayan bir sitokindir. Bu sitokin, inflamasyonun bir mediatörü olarak görev almakta ve proinflamatuvar özelliklere sahiptir. Özellikle iskemik doku zedelenmesi durumlarında IL-18, nötrofil kemotaksisinin oluşumunu artırarak inflamatuvar süreçlere katkıda bulunur.

Yapılan deneysel çalışmalarda, akut tübüler nekroz vakalarında kaspaz-1 aracılığıyla hücre içinde IL-18 seviyelerinde artış gözlenmiştir (139). Bu bulgular, IL-18'in akut böbrek hasarı patogeneğinde etkili bir faktör olduğunu ve özellikle hücresel düzeyde kaspaz-1 aracılığıyla regüle edildiğini göstermektedir.

2.9. Monoterpenler

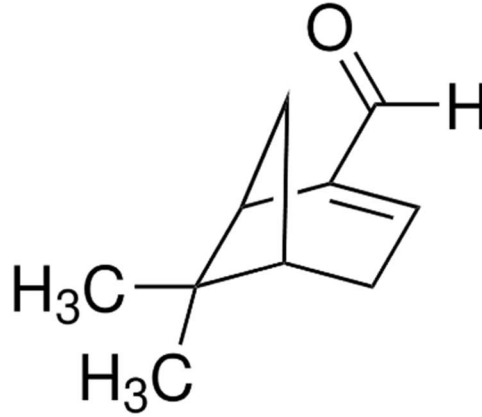
Doğal ürün ve/veya doğal ürün molekülleri, ilaç keşfi ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Son 30 yılda onaylanmış ilaçların önemli bir bölümü doğrudan veya dolaylı olarak doğal ürünlerden oluşur (140). Umut verici farmakolojik aktiviteye sahip moleküller arasında, birçok bitkinin uçucu yağlarında yaygın olarak bulunan fitokimyasallar grubuna ait olan monoterpenler bulunmaktadır (141). Monoterpenler, bitkilerde, mantarlarda, bakterilerde ve gymnospermelerde bulunan, iki izoprenoid biriminden oluşan aromatik bileşiklerdir. Monoterpenler yapıları şunlardır.

- Çift bağlar: Bu, iki karbon atomunun iki elektron çifti ile bağlandığı bölgelerdir ve onları daha reaktif hale getirir.
- İndirgenmiş fonksiyonel gruplar: Karbon iskeletine bağlı atomlar veya atom gruplarıdır ve kimyasal davranışı etkileyebilir. Monoterpenlerde, bu fonksiyonel gruplar diğer türdeki moleküllere göre daha az bulunur ve bu da belirli özelliklere yol açar.

Çift bağlar ve belirli fonksiyonel gruplar, oksijenle kolayca reaksiyona girebilir (oksitlenir). Böylece ROS ile reaksiyona girerek, monoterpenler onları nötralize edebilir ve hasara neden olmalarını önleyebilir. Bu da bu bileşiklerin potansiyel antioksidan özelliklerini kanıtlamaktadır (142). Monoterpenlerin: deneysel Alzheimer (143), Parkinson (144), epilepsi (145), inme gibi (146-148) nöro-dejeneratif hastalık modellerinde antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri ile iyileştirici ve koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir.

2.10. Myrtenal

Myrtenal (Myrt) [(-)-Myrtenal, (1R)-2-pinen-10-al, (1R)-6,6-dimetilbisiklo[3.1.1]hept-2-en-2-karboksaldehit, C₁₀H₁₄O] doğal kökenli bir bisiklik monoterpen türevidir (Şekil 1) (149).



Şekil 2. 12. Myrt'nin kimyasal yapısı (149).

Myrt; okaliptüs, nane, biber ve kimyon gibi birçok bitki türünün uçucu yağlarında bulunan terpenoidlerden türetilir (19). 2 izopren biriminden oluşan Myrt, bu birimlere dayanarak güçlü bir koku ve tat oluşumunu sağlar (150). Memelilerdeki metabolizmasına ilişkin bilgiler sınırlıyken, bitkilerde, Myrt pinen metabolizmasında bir geçiş bileşiğidir. Bitkilerdeki α -pinen, myrtenole metabolize edildikten sonra Myrt'ye dönüşür. Hücrede esas olarak membranda ve sitoplazmada bulunur. Myrt hücre veya organel zarlarının yapımını ve bakımını destekleyen membran stabilize edici bir etkiye sahiptir (149). Myrt lipid yapısında olup suda çözünmez ve nispeten nötr bir yapıya sahiptir (149). Myrt'nin herhangi bir toksisite araştırması bildirilmemiştir (151). Myrt ile yapılan ilk çalışmalar bileşiğin bronkodilatör, antiinflamatuvar, antiagregatif, antihemolitik, hipotansif ve antibakteriyel etkileri ortaya koymuştur (152, 153). Günümüzde artan sayıdaki çalışma Myrt'nin anti-inflamatuvar, antidiyabetik, anti-oksidan, analjezik ve anti-kanserojen özelliklerini iyi tanımlamıştır (154).

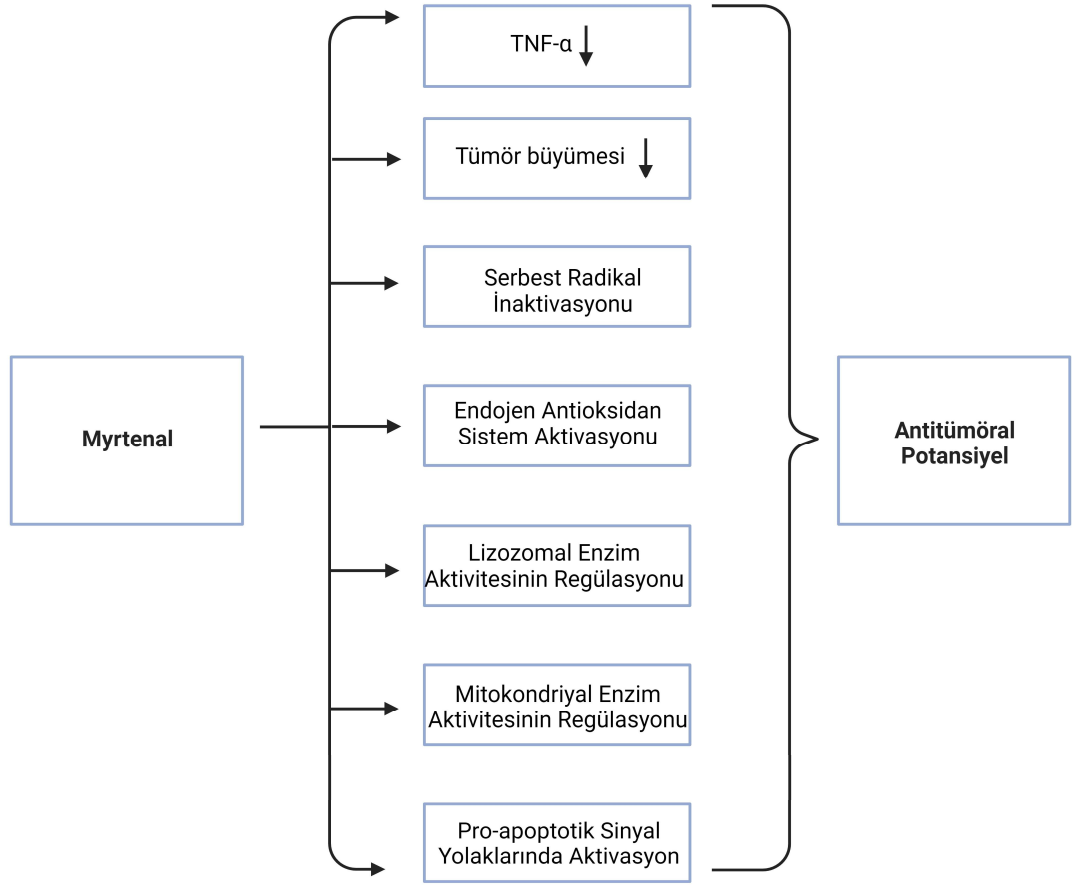
2.10.1. Myrtenalin Antioksidan ve Antiinflamatuvar Etkileri

Myrt'in birçok dokuda antioksidatif ve anti-inflamatuvar etki gösterdiği ortaya konmuştur. DM oluşturulan sıçanlarda Myrt uygulanması karaciğer ve pankreas dokusunda SOD, CAT, GSHx düzeyini arttırmış, artan TNF- α ve IL-6 seviyesini ise baskılamıştır (155). Yüksek yağlı diyetle ateroskleroz oluşturulan sıçanlarda Myrt

uygulanması lipid profilindeki bozulmaları düzenleyerek aterojenik indeksi kısmen düzeltmiştir. Myrt bu etkisine ek olarak serumda artan inflamatuvar parametrelerin (IL-1 β , IL-6) seviyesini azaltmıştır (154). Demanslı farelerde Myrt, endojen antioksidan sistem (GSH,CAT,SOD) aktivitesini arttırarak, beyni oksido-inflamatuvar stresten korumuştur (156). Parkinson hastalığı oluşturulan sıçanlarda; Myrt, beyinde GSH ve CAT enzim aktivitesini arttırmıştır (157). Radyofrekans/mikrodalga elektromanyetik radyasyona maruz bırakılan farelerde Myrt, antioksidan kapasiteyi güçlendirerek (SOD,CAT,GSHx) artan oksidan (MDA ve Nitrik oksit) ve inflamatuvar belirteçlerin (TNF- α) seviyesini azaltmıştır (158). Nod benzeri reseptör proteini 3 (NLRP3) inflamazomları hücrel hasara yanıt olarak ve proinflamatuvar sitokinler (IL-1 β gibi)'in salınımı ve reaktif oksijen türlerinin üretimine aracılık eder (159). Li ve ark, romatoid artrit oluşturulan sıçanlarda Myrt'nin IL-1 β ve TNF- α plazma seviyelerinin düşürülmesine aracılık ettiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada *in vitro* olarak NLRP3 aktivasyonun, Myrt uygulanması ile baskılandığı da gösterilmiştir (160).

2.10.2 Myrtenalin Antikanserojen Özellikleri

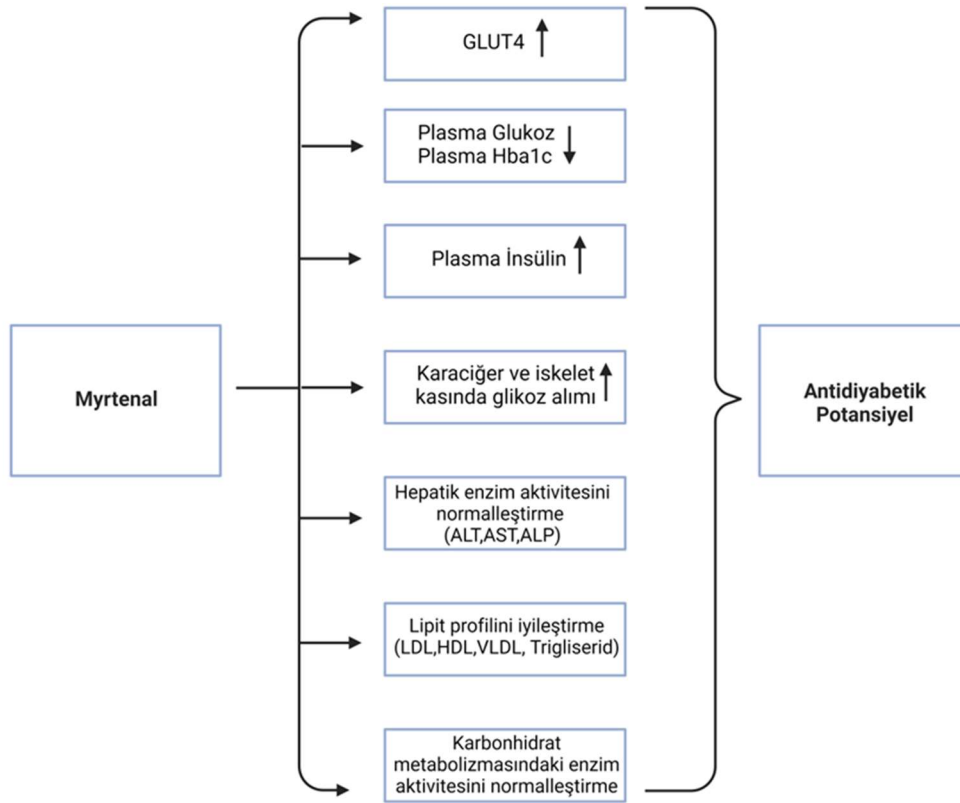
Myrt, *in vitro* melanoma hücre yüzeyindeki V-tipi ATPaz'ı inhibe ederek, sitotoksositeye neden olmuştur. Aynı çalışmada Myrt farelerde melanom metastazının yayılmasını azaltmıştır (161). Kolon kanseri oluşturulan sıçanlara uzun dönem (30 hafta) yüksek dozda Myrt uygulanması (230 mg/kg) antioksidan enzim aktivasyonu (SOD, GSHx) yoluyla serbest radikalleri etkisiz hale getirmiş ve kolon karsinogenezinin inhibisyonuna neden olmuştur (162). Sıçanlarda incelenen bir dizi karaciğer kanseri modelinde ise, Myrt çeşitli lizozomal ve mitokondriyal enzimlerin aktivitesini düzenleyerek pro-apototik sinyal yollarını aktive etmiştir. Ayrıca karaciğerde TNF- α protein seviyesi ile antioksidan enzim aktivitesini düzenleyerek MDA seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir (163-165). Sıçanlarda mesane kanseri modelinde Myrt, dokudaki MDA seviyesi ile TNF- α ve IL-6 düzeylerini kanser grubuna kıyasla düşürmüştür (166). Myrt ayrıca kaspaz-3 aktivitesini arttırarak ederek pro-apoptotik bir etki göstermiştir. Böylece tümör büyümesi azalmıştır (166). Myrt'nin antikanserojenik potansiyeli şekil 2.13'de özetlenmiştir.



Şekil 2. 13. Myrt'in antitümöral özellikleri

2.10.3 Myrtenalin Antidiyabetik Özellikleri

Sıçanlarda streptozotosin (STZ) ile indüklenen diabetes mellitus (DM) modelinde Myrt; antihiperglisemik etkisini, plazma glukoz düzeyini düşürerek ve plazma insülin seviyesinde meydana gelen bozuklukları düzelterek gösterdi. Bileşik bu etkisini, karaciğerde ve iskelet kasında glikoz taşıyıcılarını (GLUT4) ve insülin reseptör (IRS2) seviyesini arttırarak sağladı (167). Myrt ayrıca karaciğer ve kaslardaki glikojen içeriğini de arttırdı, glikozillenmiş hemoglobin A1c'yi (HbA1c) azalttı ve heksokinaz, glikoz-6-fosfataz, fruktoz-1,6-bifosfataz, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ve AST, ALT ile ALP enzimlerinin normal aktivasyonuna yaklaşmasına neden oldu (168). Aynı zamanda pankreatik insülin düzeylerinde ve lipid profili değerlerinde önemli iyileşmelere (trigliserit, LDL, VLDL, HDL) katkı sağladı (169). Myrt'nin antidiyabetik potansiyeli şekil 2.14.'te özetlenmiştir.



Şekil 2. 14. Myrt'nin antidiyabetik özellikleri

2.10.4. Myrtenalin Analjezik Özellikleri

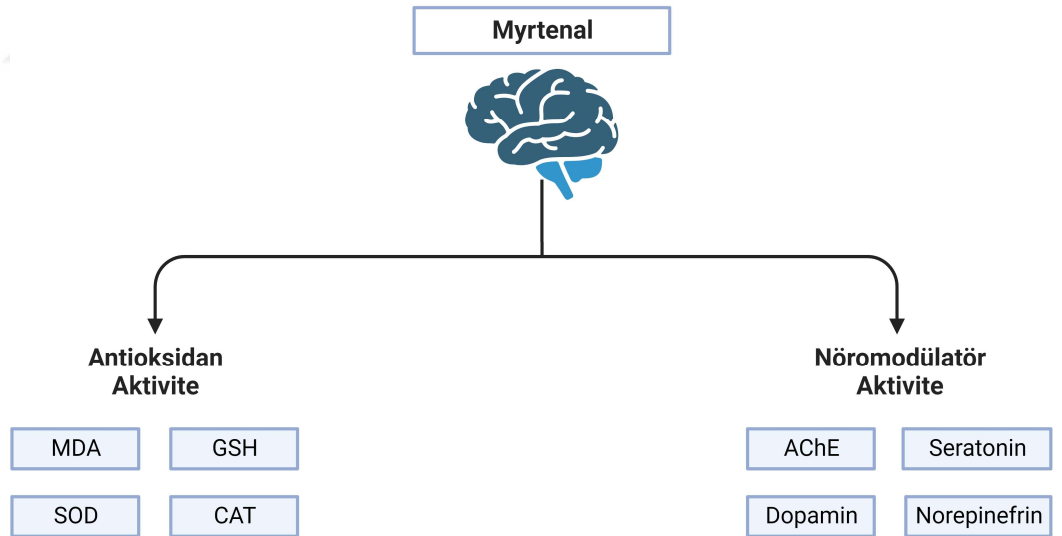
Myrtenal, bir pinen metaboliti olup α -pinenin bisiklik bir türevidir (170). Pinen ve türevlerinin çeşitli ağrı modellerinde analjezik etkileri gösterilmiştir (171). Farelerde ip Myrt uygulanması, asetik asit kıvrınma ve sıcak plaka testlerinde anti-nosiseptif etkilere sebep olmuştur (170).

2.10.5. Myrtenalin Nöroprotektif ve MSS'yi Etkileyen Özellikleri

Myrt nörobilimde nispeten az çalışılmıştır. Memelilerdeki koku nöronlarından birinin (hVN1R1) bilinen ligandı Myrt'dir ($EC_{50} \sim 1 \mu M$) (172). Kimyasal yapısı ve olası membran stabilize edici özellikleri ile lipofilik doğası, MSS alanında potansiyel etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür (173)

Asetilkolin (ACh), bilişsel ve motor fonksiyonların sürdürülmesi için önemli bir nörotransmitter olarak kabul edilir (174). ACh'nın asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından inhibisyonu bilişsel fonksiyonların zayıflamasına neden olur (175). Kaufmanna ve ark. *in vitro* bir çalışmada Myrt'in AChE inhibitörü olarak da etki gösterebileceği bildirilmiştir (176). Sıçanlarda scopolamin ile indüklenen demans modelinde 9 gün boyunca uygulanan Myrt'nin (40 mg/kg-ip) artan AChE aktivitesini

baskıladığı gösterilmiştir (177). Aynı çalışmada hayvanların açık alan testlerinde bozulan keşif aktivitesinin, Myrt uygulanmasıyla, önemli oranda düzeldiği bildirilmiştir (177). 6-OHDA ile Parkinson hastalığı oluşturulan sıçanlarda 5 gün boyunca Myrt uygulanması (50mg/kg-ip) beyindeki oksidatif stresinin ana parametrelerini azaltarak, hasarlı serebral hemisferdeki dopamin içeriğini arttırdı. Böylece koordinasyon ve keşif davranışları üzerinde (rotarot ve pasif kaçınma testi) önemli düzeltmeler meydana gelmiştir (157). Demanslı farelerde meydana gelen uzamsal hafıza bozukluğu ve anksiyetede Myrt uygulanması ile kayda değer düzeltme sağlanmıştır. Myrt'nin etkisini, endojen antioksidan sistem aktivitesini arttırarak, beyni oksido-inflamatuvar stresten korumasına atfedilmiştir (156). Gebelik ve yenidoğan dönemlerinde elektromanyetik radyasyona maruz bırakılan farelerde, Myrt uygulanması, hafıza süreçlerinde ve bazı biyokimyasal parametrelerde iyileşmeye neden olmuştur. Bu etkinin Myrt'nin, antioksidan doğasından kaynaklandığı öne sürülmüştür (158). Aynı çalışmada Myrt, kolinerjik nörotransmisyonu, dopamin, noradrenalin ve serotonin düzeylerini restore ederek, nöromodülatör özellik gösterdiği raporlanmıştır (158). Myrt'nin beyin dokusundaki antioksidan ve nöromodülatör potansiyeli şekil 2.15.'de özetlenmiştir.



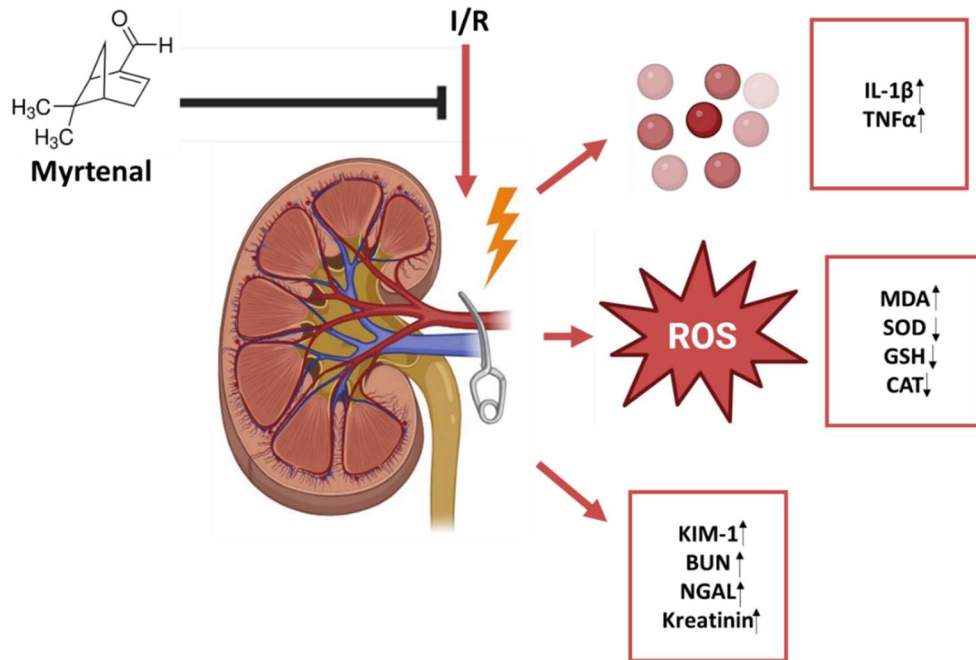
Şekil 2. 15. Myrt'nin MSS'deki antioksidan ve nöromodülatör aktivitesi

Monoterpenler ve bunların türevleri, yeni biyolojik olarak aktif bileşiklerin tasarımında ve sentezinde temel başlangıç bileşenleri olarak görev yapar. Literatürde Myrt ile ilgili yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak sentez bileşiklerine dayanmaktadır.

Concepción ve ark., nanomolar düzeyde (IC₅₀) kanser hücrelerine karşı yüksek sitotoksositeye neden olan Myrt konjugatları tanımlamıştır (178). Kemirgenlerde asetik

asitle oluşturulan kıvranma testinde diazaadamantan–Myrt konjugatı önemli analjezik etkiler sağlamıştır (179, 180). Adamantan-Myrt konjugatı influenza virüsüne ((H1N1)pdm09) karşı antiviral aktivite göstermiştir (181). Kapitsa ve ark. farelerde yükseltilmiş artı labirent testinde adamantan-Myrt konjugatının anksiyolitik etkiye neden olduğunu bildirmiştir (182). Farklı bir çalışmada Adamantan-Myrt konjugatı intakt sıçanlarda hafıza sürecini olumlu yönde etkilemiştir. Ayrıca bu konjugat hipokampüsteki norepinefrin ve serotonin düzeylerini modüle etmiştir (183).

Doğal ürün ve/veya doğal ürün molekülleri, ilaç keşfi ve geliştirilmesinde oldukça önemli bir rol oynamaya devam etmektedir. Son 30 yılda onaylanmış ilaçların yaklaşık %50'sine doğrudan veya dolaylı olarak doğal ürünlerden oluşmaktadır (140). Şu anda doğal Myrt bazlı “Myrtecaine” ile Dietil amin ve salisilik asit ile kombinasyonu kas ve eklem ağrılarının topikal tedavisinde kullanılmaktadır (184). Literatürdeki bilgiler ile Myrt'nin anti-inflamatuar, anti-oksidan ve apoptotik özellikleri, ABH'de araştırılmasını ilgi çekici hale getirmiştir. Tez çalışmamız ile Myrt'nin ABH'de meydana gelen patolojik durumdaki etki mekanizmasının seyrini nasıl etkilediğine dair kanıtlar elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızın mevcut literatür bilgiler doğrultusunda açıklanmaya çalışılan etki mekanizmaları Şekil 2.16'da özetlenmiştir. Böylece Myrt'nin ABH'nin patolojik sürecine yansımaları aydınlatılmaya çalışılmıştır.



Şekil 2. 16. Tez çalışmasında oluşturulan kurgu

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Araştırmanın Yapıldığı Merkez

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 23.01.2023 tarih ve 16869 HAYBİS protokol numaralı izniyle, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Araştırma Merkezi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Gruptaki Hayvan Sayılarının Belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak hayvan sayısı, hayvanların deneye başlama tahmini ağırlık ortalaması 260-290 gr, standart sapması 15 gr, %4 sapma, tip1 hata (α) 0.05 ve tip 2 hata (β) 0.80 olduğunda her bir grupta en az 10 hayvan olması gerektiği güç analiziyle belirlenmiştir.

3.3. Hayvanların Gruplara Ataması

Deneye başlamadan önce hayvanlar tartılarak vücut ağırlıkları kaydedildi. Belirlenen vücut ağırlıklarına göre hayvanların gruplara ataması, bilgisayar algoritmasına dayalı basit rastgele atama yöntemi ile yapıldı (MedCalc 12.7.0 for Windows) ve tek yönlü varyans analizi bulgularına göre gruplar arasında hayvanların ağırlıkları açısından fark olmadığı tespit edildi (Tablo 3.1; $p=0.253$).

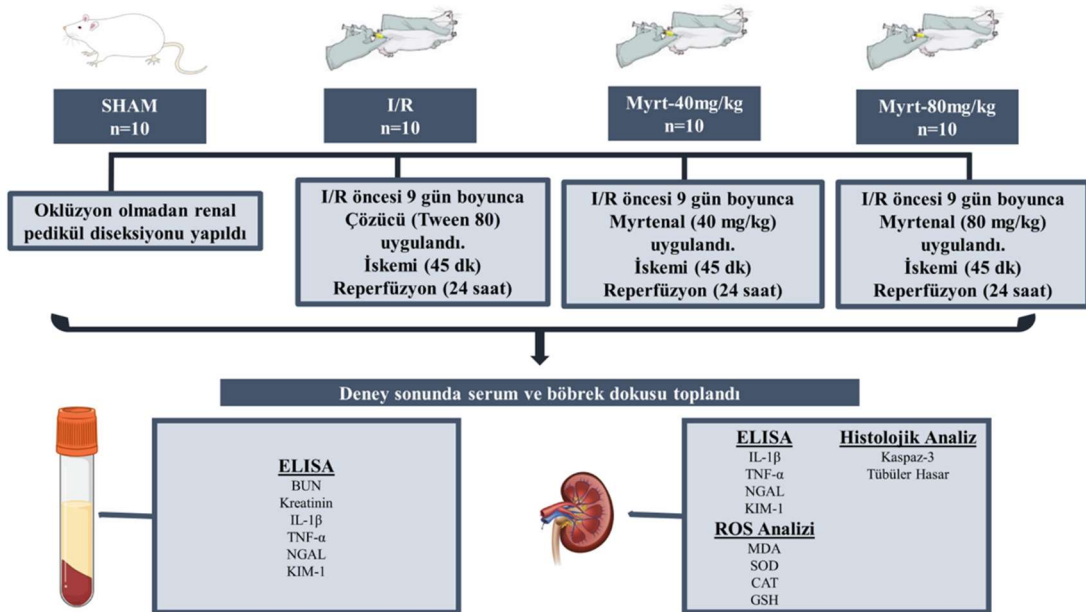
Tablo 3. 1. Grupların bilgisayar algoritması kullanılarak oluşturulması.

Gruplar	Sham	I/R	Myrt-40mg/kg	Myrt-80mg/kg	P
Hayvan sayısı (n)	10	10	10	10	
Ortalama Ağırlık (g)	260.81	261.30	258.60	259.40	
SD	14.27	16.43	15.76	17.23	0.253
En küçük ağırlık(g)	235.6	239.2	241.5	237.7	
En büyük ağırlık(g)	290.5	293.9	292.4	291.1	

3.4. Deney Hayvanları ve Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada 235-293 g ağırlığında *Sprague-Dawley* ırkı 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 4 gruba ayrılmıştır ($n=10$). Deney kapsamında oluşturulan gruplardaki hayvanlara uygulanan işlemler Şekil 3.1.'de gösterilmiştir

- **Sham:** Renal pedikül klemplenmeden diseksiyon yapıldı. Operasyon öncesi 9 gün boyunca Myrt çözücüsü Tween80 (170) uygulanmıştır
- **I/R:** İskemi hasarından önce 9 gün boyunca Myrt çözücüsü Tween80 (170) uygulanmıştır. 9. günün sonunda iki renal pedikülde klemplendikten sonra 45 dk iskemi ve akabinde 24 saat reperfüzyon sağlanmıştır.
- **Myrt-40mg/kg:** İskemi hasarından önce 9 gün boyunca Myrt düşük dozu (40 mg/kg) uygulanmıştır (177). 9. günün sonunda iki renal pedikülde klemplendikten sonra 45 dk iskemi ve akabinde 24 saat reperfüzyon sağlanmıştır.
- **Myrt-80mg/kg:** İskemi hasarından 9 gün önce Myrt yüksek dozu (80 mg/kg) uygulanmıştır (155). 9. günün sonunda iki renal pedikülde klemplendikten sonra 45 dk iskemi ve akabinde 24 saat reperfüzyon sağlanmıştır.

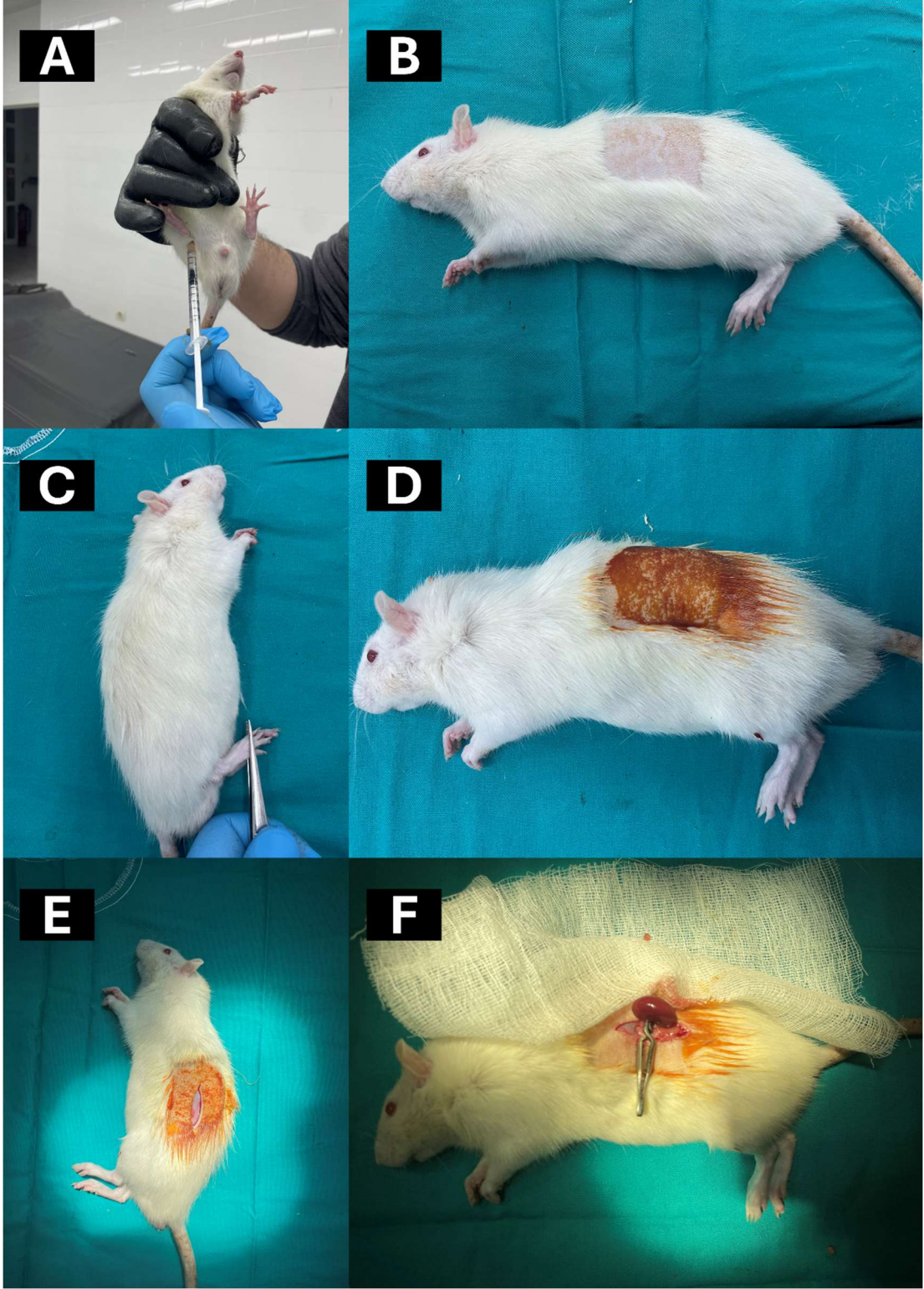


Şekil 3. 1. Deney Planı

3.5. Cerrahi Uygulama

9. gün sonunda sıçanlar intramusküler olarak 90 mg/kg ketamin (Keta-Kontrol, Doğa İlaç, Türkiye) ve 9 mg/kg ksilazin (Sanalazin20, Santavet, Türkiye) anesteziye alınmıştır (Şekil 3.2A). Akabinde sıçanların sırt kısımları traş edilmiştir (Şekil 3.2B). Daha sonra sıçanların pedal reflekslerinin kaybı sonucu anestezi altına girdikleri saptandı (Şekil 3.2C). Daha sonra, bu bölgelere povidon iyod uygulanmıştır (Şekil 3.2D). Sıçanların sırt kısımları bistüri kullanılarak insize edilerek böbreklere ulaşılmıştır (Şekil

3.2E). Renal pediküle erişim sağlandıktan sonra, bulldog klemple kan akımı kesilmiştir (Şekil 3.2F).



Şekil 3. 2. Cerrahi İşlemler: A. Hayvanların anesteziye alınması, B. Hayvanların traş edilmesi, C. Anestezi derinliğinin teyit edilmesi, D. İnsize edilecek olan kesi bölgesine

povidon iyot sürülmesi, E. Derinin insize edilmesi, F. ulaşılan böbreğe bulldopg klemp takılarak kan akımının kesilmesi

Sol renal pedikül üzerine klemp uygulaması ile 45 dakika süreyle kan akışı durdurulmuş, bu esnada gözlemlenen renk değişiklikleri kaydedilmiştir. Aynı prosedür, sağ renal pedikül üzerinde de tekrarlanmıştır. İskemi sürecinde meydana gelen sıvı kaybının etkilerini hafifletmek amacıyla, intraperitoneal yolla 2 ml serum fizyolojik verilmiştir. 45 dakikalık iskemi süresinin sonunda, klempler açılarak böbreklere reperfüze edilmiştir. Kas ve deri, cerrahi sütürler kullanılarak dikilmiş, ardından insizyon bölgesi povidon iyodin uygulanarak dezenfekte edilmiştir. Operasyon sonrası hayvanlar, optimal gözlem ve kontrol için bireysel tekli kafeslere yerleştirilmiştir.

3.6. Dokuların Toplanması

24 saatlik reperfüzyon sonunda tüm deney gruplarındaki sıçanlar, dekapite edilmiştir. Bu aşamada, sıçanların hem kan hem de böbrek dokuları toplanmıştır. Kanlar santrifüj cihazında (NF-615, Nüve, Türkiye), 5000 rpm hızında 10 dakika süreyle işlem görmüştür. Elde edilen serumlar BUN, Kreatin, NGAL, KIM-1 analizi yapılınca kadar -80°C’de muhafaza edilmiştir. Sağ böbrek dokusu histolojik analizlerde kullanılmak üzere %10 formol solüsyonuna yerleştirilmiştir. Sol böbrek dokusu ise NGAL, KIM-1, CAT, TNF- α , IL-1 β , GSH, MDA ve SOD analizi için analizler yapılınca kadar -80 °C ‘de muhafaza edildi.

3.7. Dokuların Biyokimyasal Analize Hazırlanması

-80°C’de muhafaza edilen böbrek dokuları analiz işlemlerinde kullanılmak için çıkarıldı. Doku homojenatları hazırlanırken, dokularda kalan kanın hemoliz yoluyla test sonuçlarını etkilemesini önlemek için PBS tamponu (0.01 M, pH = 7.4) kullanılarak dokulardan hemolize kanın uzaklaştırılması sağlandı. Dokuların ağırlıkları belirlendikten sonra, her biri 100 μ g doku içeren 900 μ l PBS ile homojenizatör tüplerine alındı. Bu homojenatlar, daha sonra homojenizatörde +4 °C’de 5 dakika süreyle 5000xg hızında santrifüj edilerek süpernatant ayrıştırıldı. Süpernatantlardan toplam protein konsantrasyonu, ticari bir BCA kiti kullanılarak tayin edildi

3.7.1. SOD Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi McCord ve ark. tarafından geliştirilen bir yöntem kullanılarak ölçülmüştür (185, 186). Bu ölçümde, H_2O_2 , nitroblue tetrazolium (NBT)'yi nitroblue tetrazolium formazan (NBT-F)'a dönüştürerek SOD aktivitesi belirler. Assay reaktifi, xanthine oxidase (187), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), NBT, sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve bovine serum albümin (BSA) çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

96'lı plakanın her kuyucuğa 285 mikrolitre hacminde hazırlanan Assay reaktifi ve 5 mikrolitre XO eklenmiştir. XO, H_2O_2 'yi nitroblue tetrazolium (NBT)'yi nitroblue tetrazolium formazan (NBT-F)'a dönüştürerek reaksiyona girer. Daha sonra, assay reaktifine SOD aktivitesini ölçmek amacıyla 2 mikrolitre süpernatant eklenir.

37 °C'de 20 dk inkübe edilir. İnkübasyon süresinin sonunda, NBT-F oluşumu spektrofotometrede (BioTEK Synergy HTX, Kanada) 560 nm dalga boyunda ölçülür. Bu ölçüm, NBT-F'nin absorbansındaki değişim üzerinden SOD aktivitesini belirlemek amacıyla gerçekleştirilir.

3.7.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin ölçümü

CAT aktivitesi Aebi'nin metoduna göre ölçülmüştür (188). Kullanılan reaktifler şunlardır: Fosfat tamponu (pH 7.0, 50 mM) ve fosfat tamponu kullanılarak absorbansı 0.500 nm'ye ayarlanmış olan H_2O_2 çözeltisi. H_2O_2 , deney ortamına eklenen süpernatantaki CAT tarafından su ve oksijene parçalanır, bu da 240 nm'de maksimum absorbansı sağlar. Bu durum, uv spektrumunda absorbans azalmasına neden olur ve absorbanstaki azalma, CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. CAT ünitesi, birim zamanda bir mikromol H_2O_2 'yi suya çeviren enzim miktarını temsil eder.

Deneyin yapılışı şu şekildedir: Fosfat tamponunun kullanıldığı spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda sıfır ayarı yapıldıktan sonra, H_2O_2 çözeltisi aynı tamponla dilüe edilerek 0.500 absorbans elde edildi. Bu çözelti substrat olarak kullanıldı. Numune substrata eklenerek, 15 saniye arayla olmak üzere 5 dakika süresince absorbans azalması kaydedildi. Hesaplamada, 1 dakikalık lineer absorbans azalması değerleri temel alındı. Bu yöntem, CAT aktivitesinin hassas bir şekilde belirlenmesini sağlar ve deneyin kademeli olarak gerçekleştirilen ölçümleri, katalazın etkinliğini değerlendirmek için kullanılır.

Tablo 3. 2. CAT analizi için kullanılan reaktifler

	Kör	Numune
Fosfat Tamponu (50 mM, pH=7)	3 ml	-
H2O2 çözeltisi (A240=0.500)	-	2,99 ml
Süpernatant	-	0,01 ml

Hesaplama: Sonuçlar, k/g protein olarak hesaplandı. $k = [2.3 \times \log (OD1/OD2)] / \Delta t$ (sn)
 $k/g \text{ protein} = k / [(g/ml \text{ protein}) \times 1000]$ (k: reaksiyon hız sabiti, OD1: başlangıç optik yoğunluk, OD2: bitiş optik yoğunluk, Δt : süre (saniye), g: gram)

3.7.3. Glutasyon Ölçümü

Kullanılan reaktifler şunlardır: 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (1,5 mg/ml), GSH redüktaz (6 U/ml), NADPH (4 mg/ml), pH: 7 fosfat tamponu.

Analitik prensip, GSH konsantrasyonunun Beutler ve ark. metoduna göre belirlenmesini içerir (189). Bu metodoloji, GSH seviyesinin ölçümünü 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellmann's solüsyonu) ile sülfhidril gruplarının sarı renk oluşturmaya prensibine dayanır. Oluşan renk, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek GSH seviyesi belirlenir. Elde edilen sonuçlar, GSH seviyesini $\mu\text{mol/g}$ protein cinsinden ifade eder.

Tablo 3. 3. Glutasyon analizi için kullanılan reaktifler

Kör	Numune
1 ml tampon	1 ml tampon
10 μl numune	10 μl distile su
50 μl NADPH	50 μl NADPH
20 μl DTNB	20 μl DTNB
20 μl GSH redüktaz	20 μl GSH redüktaz

Metodoloji şu adımları içermektedir:

1. Hazırlık:

- Numuneler vortexle karıştırılır ve ardından 5 dakika beklenir.

2. Spektrofotometrik Okuma:

- Numunelerin absorpsanları 412 nm dalga boyunda ölçülür.
- Okuma öncesinde köre sıfırlama yapılır.

3. Hesaplama:

- Standart GSH solüsyonları, 2500-1000-500-250-100-10 $\mu\text{mol/g}$ protein konsantrasyonlarında hazırlanır.

- Bu standart solüsyonlarının konsantrasyonlarına bağlı olarak ölçülen absorbans değişimleri grafiğe çizilir.
- Elde edilen absorbans değişim grafiği kullanılarak numune absorbanslarından yola çıkarak, numunelerin GSH konsantrasyonları $\mu\text{mol/g}$ protein cinsinden hesaplanır.

Bu süreçte, standart GSH solüsyonlarının absorbans değişimlerine dayanarak, numunelerin GSH konsantrasyonlarını hesaplanır ve numunelerin GSH seviyeleri mikromol $\mu\text{mol/g}$ protein biriminde ifade edilebilir.

3.7.4. Malondialdehit Ölçümü

MDA analizi, Esterbauer ve Cheeseman'ın yöntemine dayanmaktadır (190). Bu yöntem, lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Analizlerde, tiobarbitürik asit (191) çözeltisi, triklorasetik asit (TCA) çözeltisi ve 1,1,3,3-tetrametoksipropan (standart) gibi reaktifler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

TBA, asidik bir ortamda 90-95°C sıcaklıkta MDA ve diğer TBARS (TBA reaktif maddeler) ile reaksiyona girer. Bu reaksiyon sonucunda pembe renkli bir kromojen oluşur. Numuneler, bu reaksiyona tabi tutulduktan sonra 15 dakika kaynatılır, ardından hızla soğutulur ve absorbansları 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

Tablo 3. 4. MDA analizi için kullanılan reaktifler

	Numune	Kör
Homojenat	0,5 ml	-
TCA (%10)	2,5 ml	2,5 ml
Distile su	-	0,5 ml

Cam tüplere alınan numuneler, 90 °C'de 15 dakika süreyle ısıtılma tabi tutulmasının ardından, bir sonraki adım olarak 3000×g'de 10 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutuldu.

Tablo 3. 5. MDA analizi için TCA reaktifinin eklenme basamakları

	Numune	Kör
Supernatant	2 ml	2
TCA (%10)	1 ml	1 ml

90 °C 15 dakika bekletilir, soğutulur ve köre karşı 532 nm'de okunur.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar, 20 mM/L stok standart çözeltisinden seyreltilmiş olup, numunelerle aynı standart koşullarda çalışıldı. Elde edilen sonuçları kullanılarak standart bir grafiğin çizimi gerçekleştirildi. Standart grafiğinden elde edilen eğim sabiti, analiz edilen numunelerin lipid peroksidasyon seviyelerini belirlemede temel bir parametre olarak kullanıldı. Bu eğim sabiti, numunelerin ölçüm değerlerine uygulanarak MDA miktarı yaş gram doku başına nanomol cinsinden hesaplandı.

3.7.5. NGAL, KIM-1, TNF- α ve IL-1 β Düzeyinin Ölçülmesi

NGAL (201-11-0763, SunRed, Çin), KIM-1 (201-11-0550, SunRed, Çin), TNF- α (201-11-0765, SunRed, Çin), IL-1 β (201-11-0120, SunRed, Çin) analizleri kapsamında satın alınan sıçan spesifik ticari ELISA kitlerindeki protokoller izlenerek ölçümler yapıldı. Bu kapsamda :

Öncelikle standartlar hazırlandı

1. Hazırlanan standart ve numuneler kuyucuklara eklendi.
2. Daha sonra numunelerin üzerine antibody eklendi. Akabinde tüm kuyucuklara Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi.
3. Plate kapatıldıktan sonra 60 dk 37°C’de inkübe edildi.
4. Plate yıkama tamponu ile her kuyucuğa 0.3 ml olacak şekilde mikropłaka yıkayıcı ile yıkandı.
5. Her kuyucuğa Kromojen A ve Kromojen B solüsyonu eklendi.
6. Plate 10 dk boyunca 37°C’de inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda 50 μ l hacimde durdurma solüsyonu uygulandı.
8. Plate daha sonra spektrofotometre’de (BioTEK Synergy HTX, Kanada) 450 nm dalga boyunda okutuldu. Gen 5 yazılımıyla kullanılarak konsantrasyonları hesaplandı

3.7.6. BUN ve Kreatinin Değerlerinin Ölçümü

Çalışma gruplarındaki Kreatin ve ürenin ölçülmesi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tibbi Biyokimya A.D. Laboratuvarlar’nda Cobas 1600 tam otomatik biyokimya otoanalizatöründe (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) hizmet alımı yapılarak ölçüldü.

3.8. İstatiksel Analiz

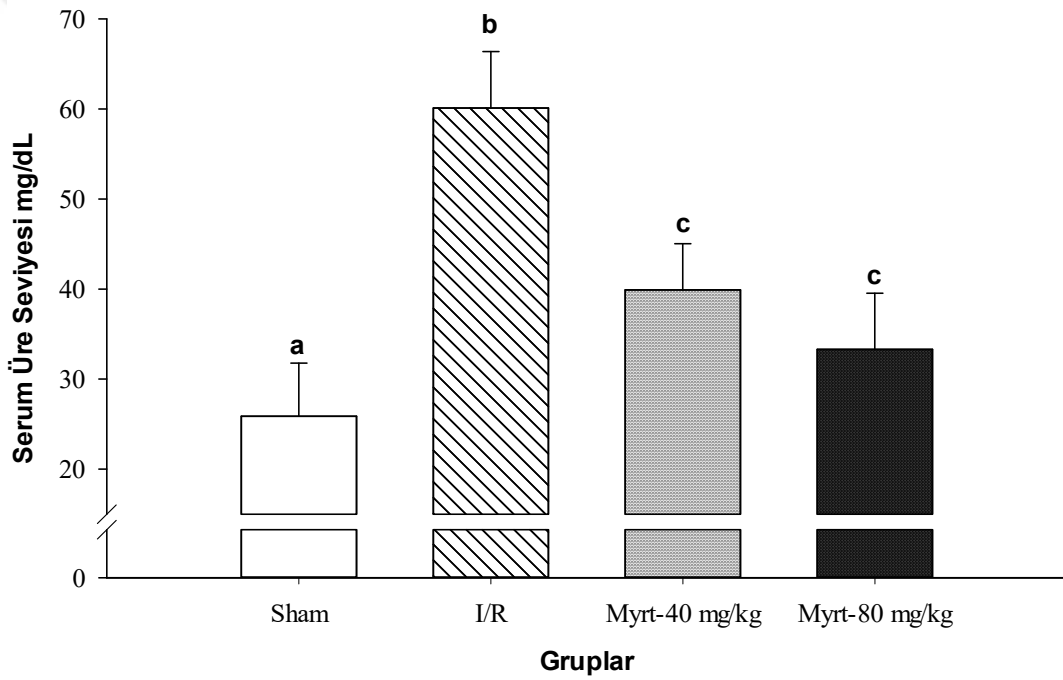
Analizlerde, verilerin istatistiksel işlenmesi için IBM SPSS Statistics 24.0 for Windows paket programı kullanılmıştır. Nicel veriler, ortanca (ortalama $\pm$ standart sapma) ile özetlenmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu, Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası nicel değişken karşılaştırmalarında ise Kruskal-Wallis H testi kullanılmıştır. Anlamli farklılıklar tespit edildiğinde, çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. $p < 0.05$ değeri İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir



4. BULGULAR

4.1. Myrt'nin Serum Üre Seviyeleri Üzerine Etkileri

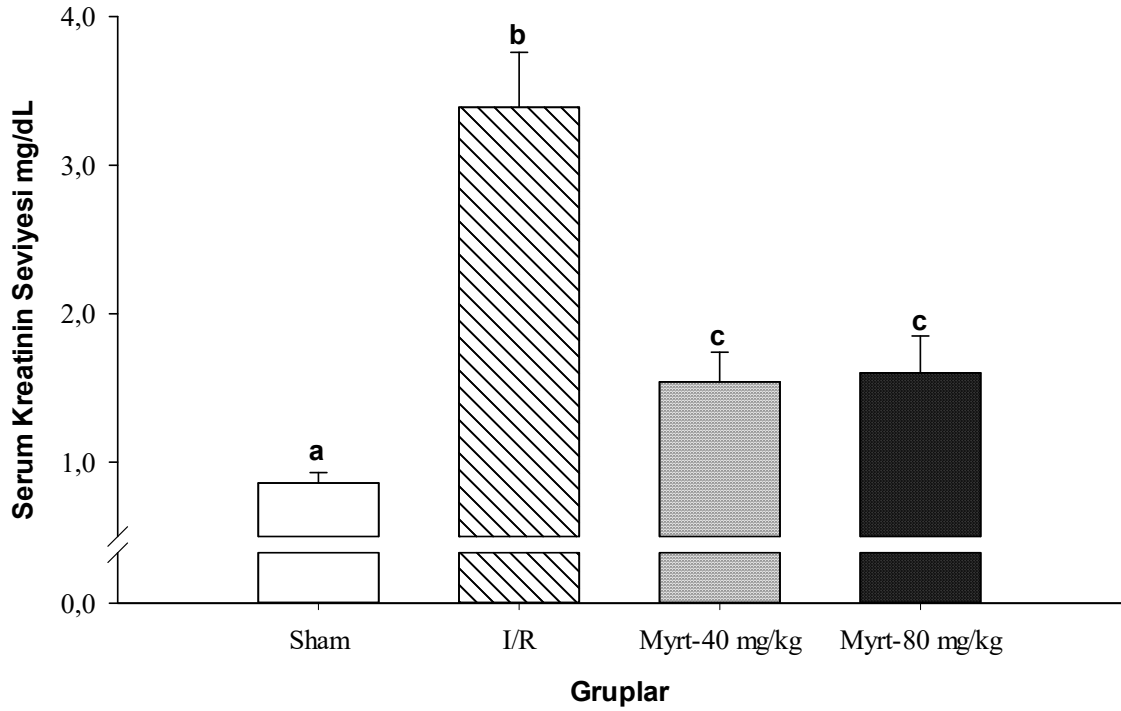
Grupların serum üre seviyeleri Şekil 4.1 'de sunulmuştur. I/R grubunun serum üre seviyesi sham grubuna kıyasla önemli ölçüde artış gösterirken ($p<0.05$), Myrt uygulanan gruplarda serum üre seviyesinde I/R grubuna oranla belirgin bir azalma olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4. 1. Deney ve uygulama gruplarının serum üre seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ^{a,b, c} $p<0.05$)

4.2. Myrt'nin Serum Kreatin Seviyesi Üzerindeki Etkisi

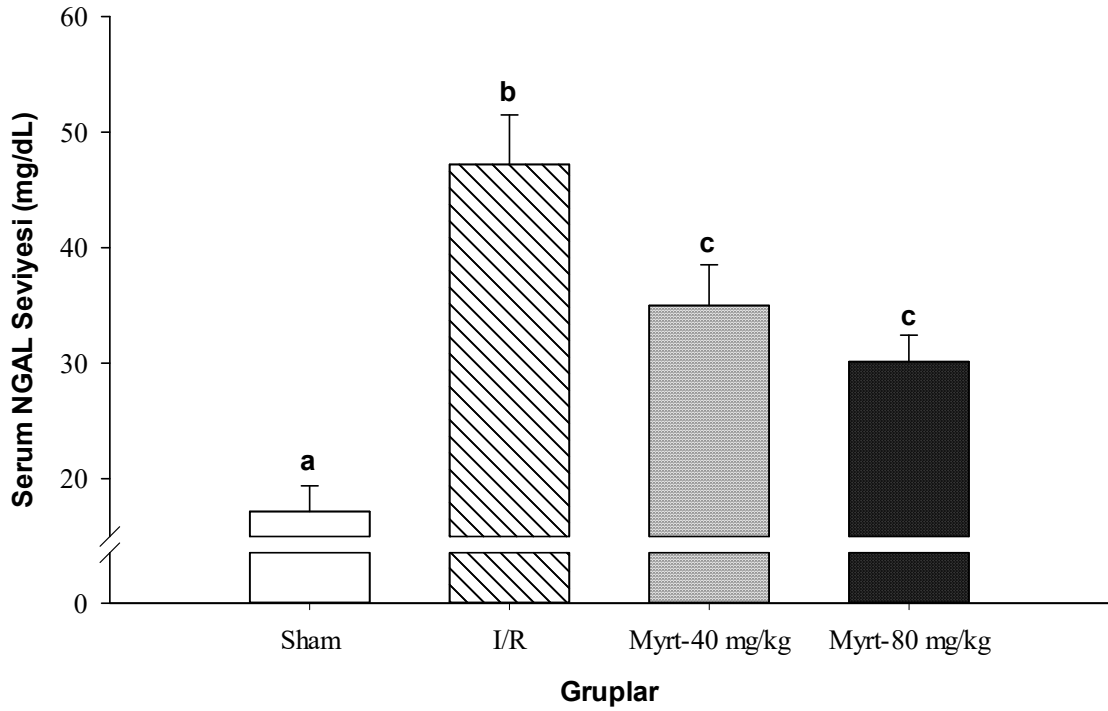
Grupların serum kreatinin seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Kreatinin seviyesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında; I/R grubunda serum kreatinin seviyesi sham grubuna göre yüksek olduğu ($p<0.05$), Myrt uygulanan (40 ve 80 mg/kg) gruplarda ise I/R grubuna kıyasla önemli miktarda azalma olduğu ($p<0.05$) ancak bu azalmaya rağmen halen daha sham grubuna kıyasla yüksek düzeyde ($p<0.05$) olduğu belirlendi.



Şekil 4. 2. Deney ve uygulama gruplarının serum kreatinin seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ^{a,b, c} $p<0.05$)

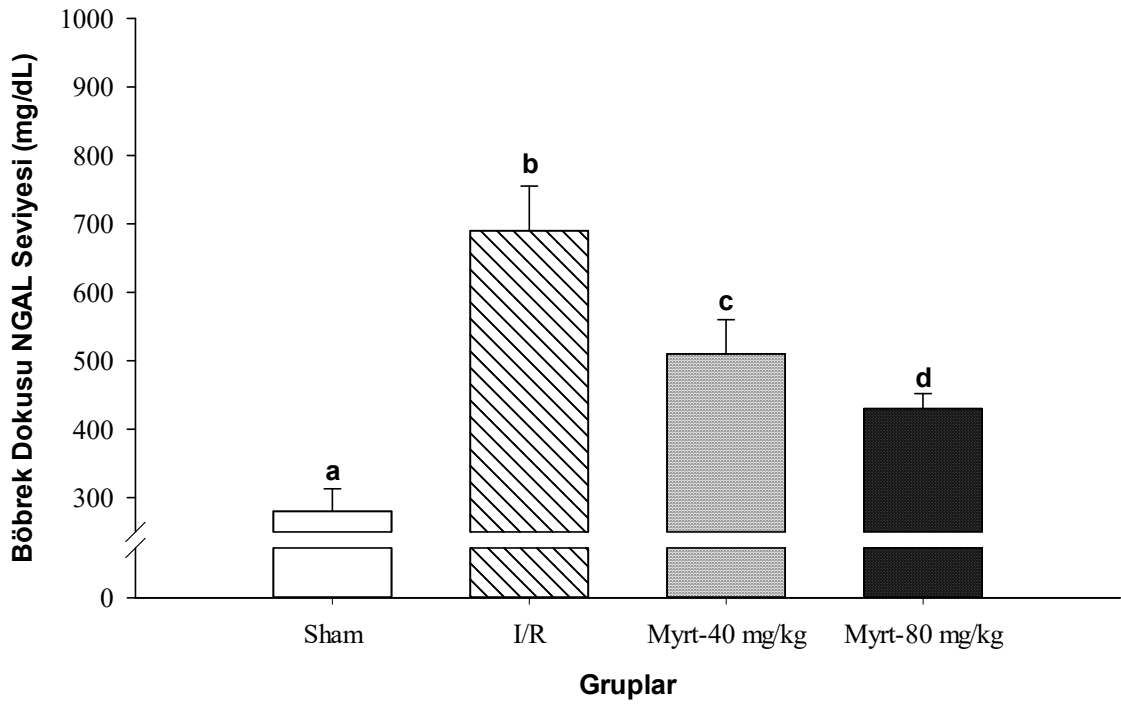
4.3. Myrt'nin Serum ve Böbrek NGAL Seviyesi Üzerindeki Etkileri

Grupların serum NGAL seviyeleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Deney grupları arasında serum NGAL seviyeleri karşılaştırıldığında, I/R uygulanan grupta NGAL seviyesinin sham grubuna göre önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Diğer taraftan, Myrt uygulanan gruplarda (40 ve 80 mg/kg) doz bağımsız olarak serum NGAL seviyelerinin, I/R uygulanan gruptaki sıçanlardan daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 4. 3. Deney ve uygulama gruplarının serum NGAL seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ^{a,b,c} $p<0.05$)

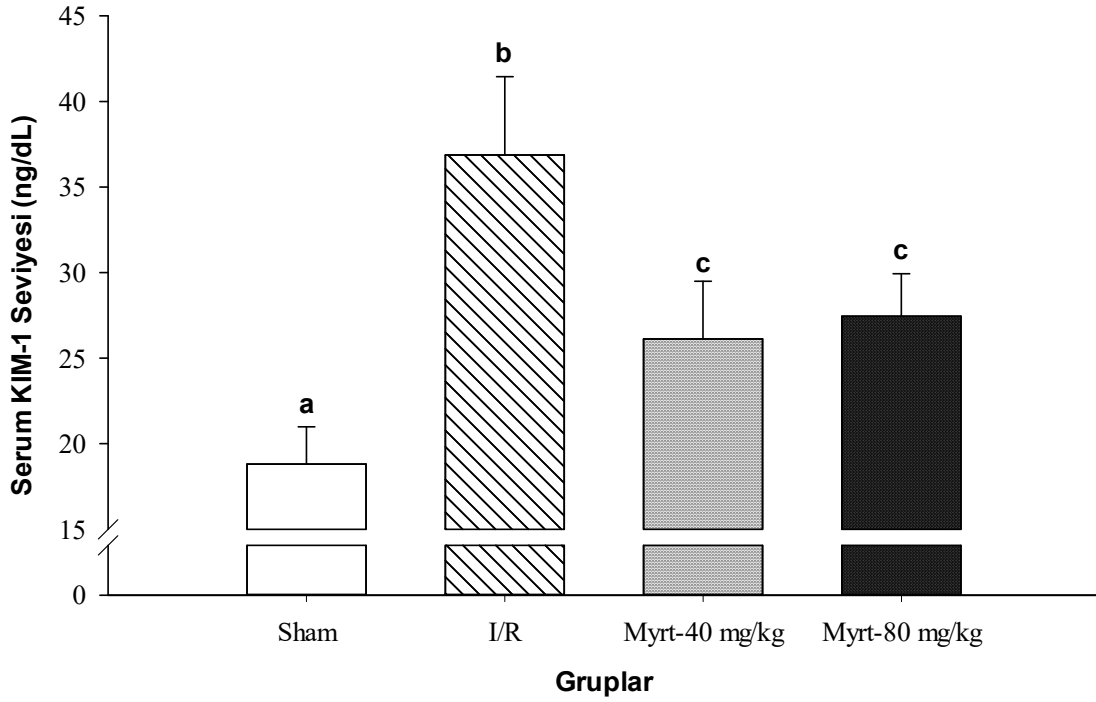
Grupların böbrek dokusundaki NGAL seviyeleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Deney grupları arasında böbrek dokusundaki NGAL seviyeleri karşılaştırıldığında, I/R uygulanan grupta NGAL seviyesinin sham grubuna göre önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Diğer taraftan, Myrt uygulanan gruplarda (40 ve 80 mg/kg) doza bağımlı olarak böbrek dokusundaki NGAL seviyelerinin, I/R uygulanan gruptaki sıçanlardan daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 4. 4. Deney ve uygulama gruplarının böbrek NGAL seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir $a,b,c,p<0.05$)

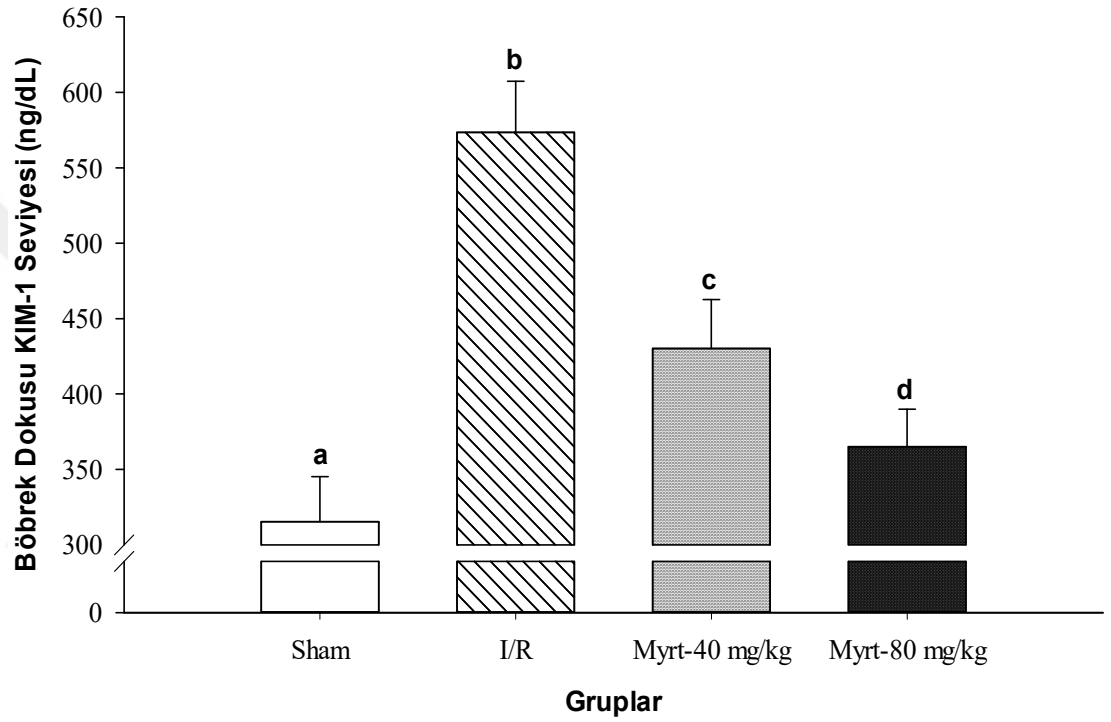
4.4. Myrt'nin Serum ve Böbrek KIM-1 Seviyesinin Üzerindeki Etkileri

Grupların serum KIM-1 seviyeleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Deney grupları arasında serum KIM-1 seviyeleri karşılaştırıldığında, I/R uygulanan grupta KIM-1 seviyesinin sham grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Diğer taraftan, Myrt uygulanan gruplarda (40 ve 80 mg/kg) doza bağımsız olarak serum KIM-1 seviyelerinin, I/R uygulanan gruptaki sıçanlardan belirgin derecede daha düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4. 5. Deney ve uygulama gruplarının serum KIM-1 seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ^{a,b,c} $p<0.05$)

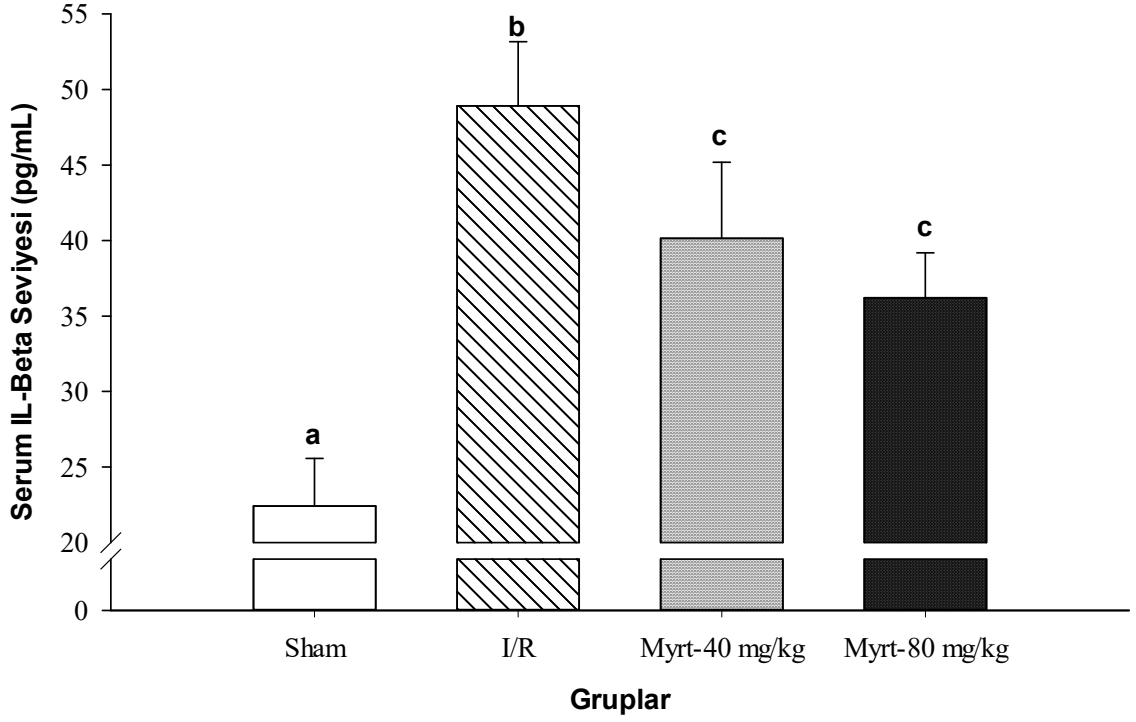
Grupların böbrek dokusundaki KIM-1 seviyeleri Şekil 4.6'da sunulmuştur. Deney grupları arasında böbrek dokusundaki KIM-1 seviyeleri karşılaştırıldığında, I/R uygulanan grupta KIM-1 seviyesinin sham grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$). Diğer taraftan, Myrt uygulanan gruplarda (40 ve 80 mg/kg) doz bağımlı olarak böbrek dokusundaki KIM-1 seviyelerinin, I/R uygulanan gruptaki sıçanlardan belirgin derecede daha düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.05$).



Şekil 4. 6. Deney ve uygulama gruplarının böbrek dokusu KIM-1 seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir $a,b,c,d,p<0.05$)

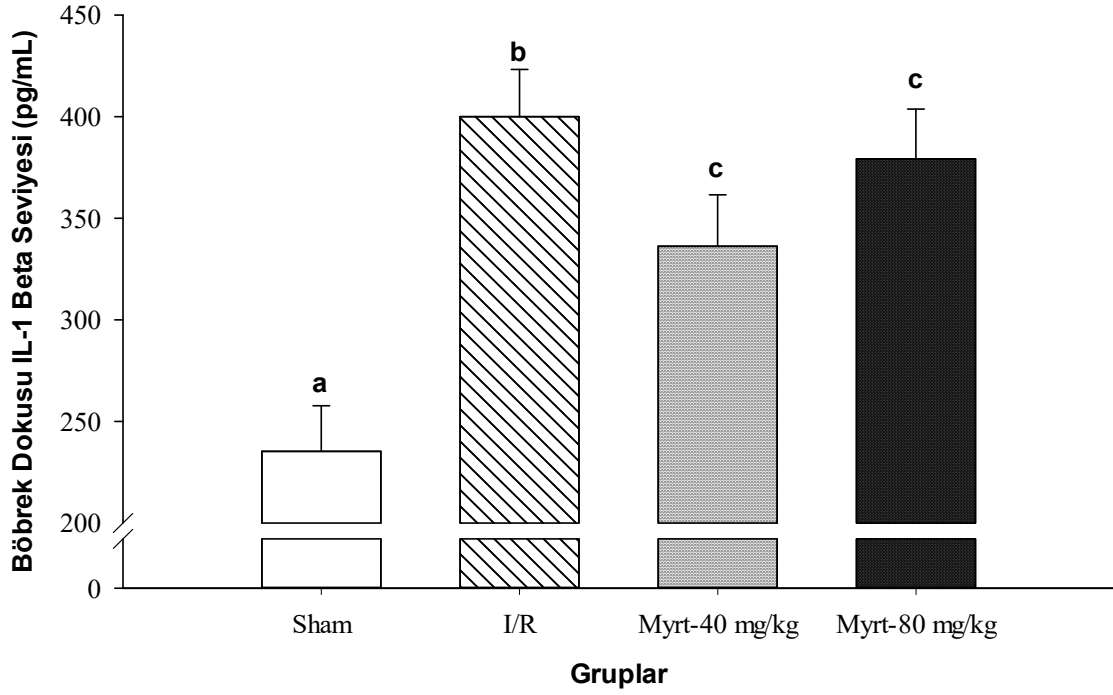
4.5. Myrt'nin Serum ve Böbrek IL- β Seviyesi Üzerindeki Etkileri

Grupların serum IL-1 β seviyeleri Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Gruplar serum IL-1 β seviyesi bakımından karşılaştırıldığında, sham grubuna göre I/R yapılan grupta IL-1 β seviyesinin önemli düzeyde artış gösterdiği belirlendi ($p<0.05$). Myrt uygulanan gruplarda ise IL-1 β seviyelerinde I/R grubuna kıyasla azalma saptandı ($p<0.05$).



Şekil 4. 7. Deney ve uygulama gruplarının böbrek dokusu IL-1 β seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ^{a,b,c} $p<0.05$)

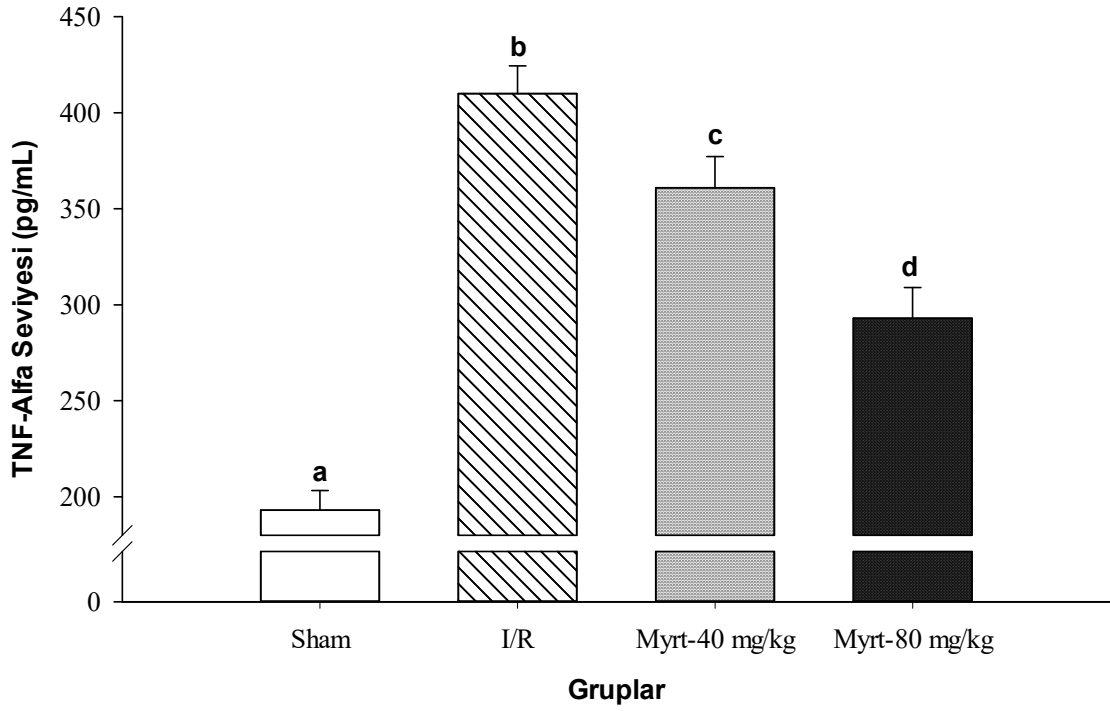
Grupların böbrek dokusunda ölçülden IL-1 β seviyeleri Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Gruplar böbrek dokusu IL-1 β seviyesi bakımından kıyaslandığında, sham grubuna göre I/R yapılan grupta IL-1 β seviyesinin arttığı ($p<0.05$), Myrt uygulanan gruplarda ise I/R grubuna kıyasla azaldığı tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4. 8. Deney ve uygulama gruplarının böbrek dokusu IL-1 β seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir $a,b,c p<0.05$)

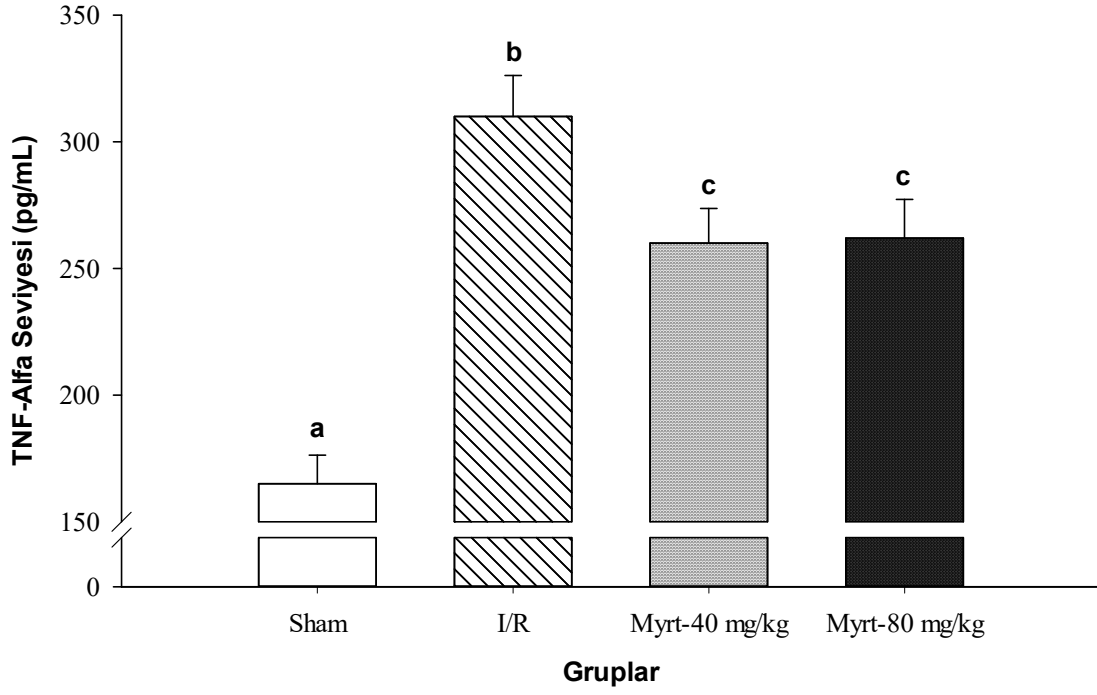
4.6. Myrt'nin Serum ve Böbrek IL- β Seviyesi Üzerindeki Etkileri

Grupların serum TNF- α seviyeleri Şekil 4.9.'da böbrek dokusundaki TNF- α düzeyleri ise Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. Deney grupları serum TNF- α seviyesi bakımından karşılaştırıldığında, sham grubuna göre I/R uygulanan grupta TNF- α seviyesinde önemli ölçüde artış gözlemlendi ($p<0.05$). Myrt-40 ve Myrt-80 gruplarının serum TNF- α seviyelerinin ise I/R grubuna göre önemli düzeyde azaldığı ($p<0.05$) ve bu azalmanın doz bağımlı olduğu ($p<0.05$) belirlendi.



Şekil 4. 9. Deney ve uygulama gruplarının serum TNF- α seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir $a,b,c,d,p<0.05$)

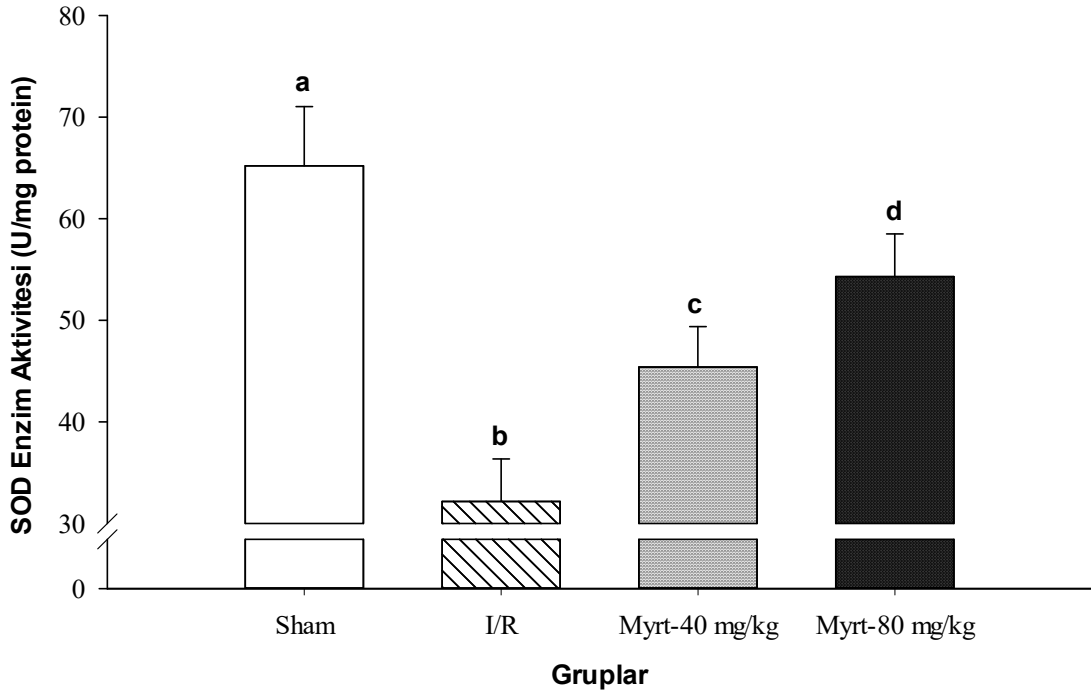
Gruplar böbrek dokusundaki TNF- α düzeyleri açısından karşılaştırıldığında; I/R grubundaki sıçanların böbrek dokusundaki TNF- α seviyesinin sham grubuna göre yüksek ($p<0.05$), Myrt uygulanan gruplarda ise I/R grubuna göre düşük seviyede ($p<0.05$) olduğu belirlendi.



Şekil 4. 10. Deney ve uygulama gruplarının böbrek TNF- α seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ^{a,b,c} $p<0.05$)

4.7. Myrt'nin SOD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

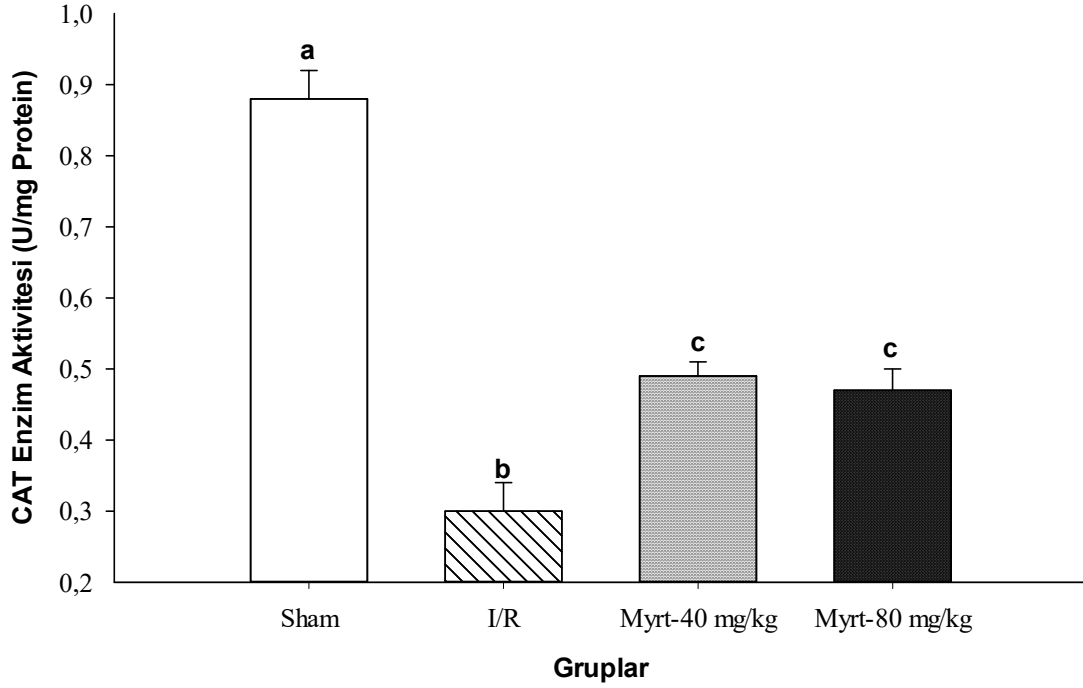
Grupların SOD enzim aktiviteleri Şekil 4.11.'de gösterilmiştir. I/R grubunda SOD aktivitesinde azalma olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Myrt uygulanan grupların hepsinde I/R grubunda azalmış olan SOD enzim aktivitesinde önemli miktarda artış olduğu belirlendi ($p<0.05$). Meydana gelen bu artışın ise Myrt uygulanan gruplarda doz bağımlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4. 11. Deney ve uygulama gruplarının böbrek dokusu SOD enzim aktivitesi (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir $a,b,c,d,p<0.05$)

4.8. Myrt'nin Katalaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

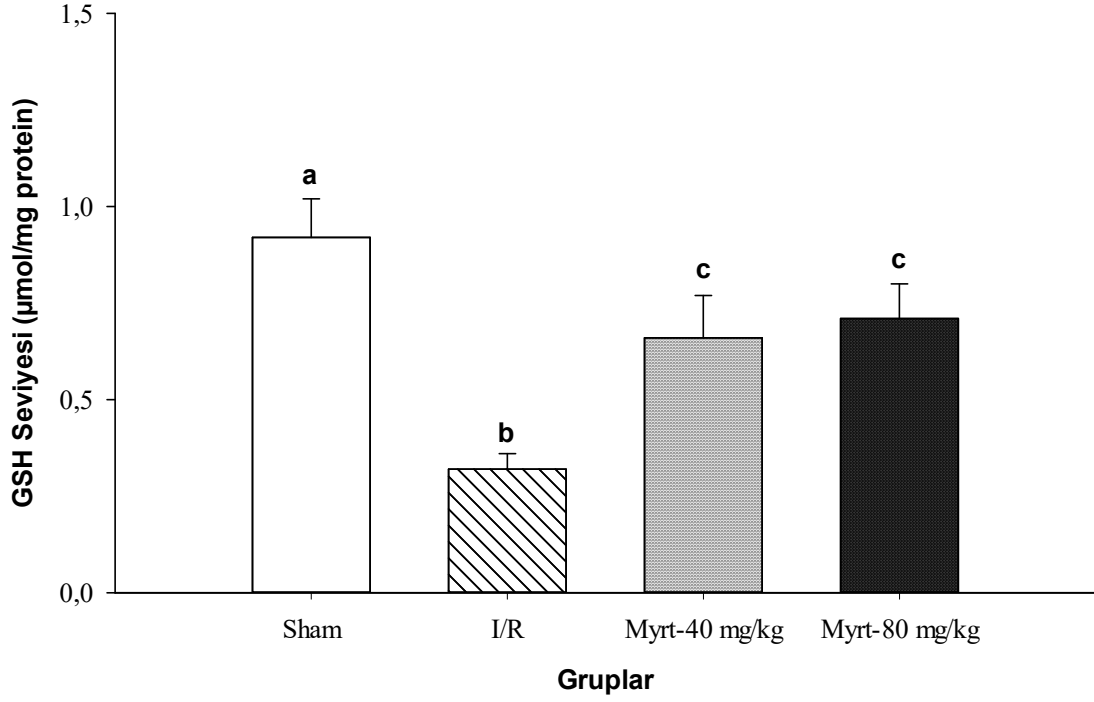
Deney gruplarının CAT enzim aktivitesi Şekil 4.12.'de sunulmuştur. Sham grubuna göre I/R grubunda CAT enzim aktivitesinde azalma ($p<0.05$), Myrt-40 ve Myrt-80 gruplarının CAT enzim aktivitesinde ise I/R grubunda artış görüldü ($p<0.05$). Meydana gelen bu artış Myrt gruplarında doz bağımlı değildi.



Şekil 4. 12. Deney ve uygulama gruplarının CAT enzim aktivitesi (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ^{a,b, c} $p<0.05$)

4.9. Myrt'nin GSH Seviyesi Üzerine Etkisi

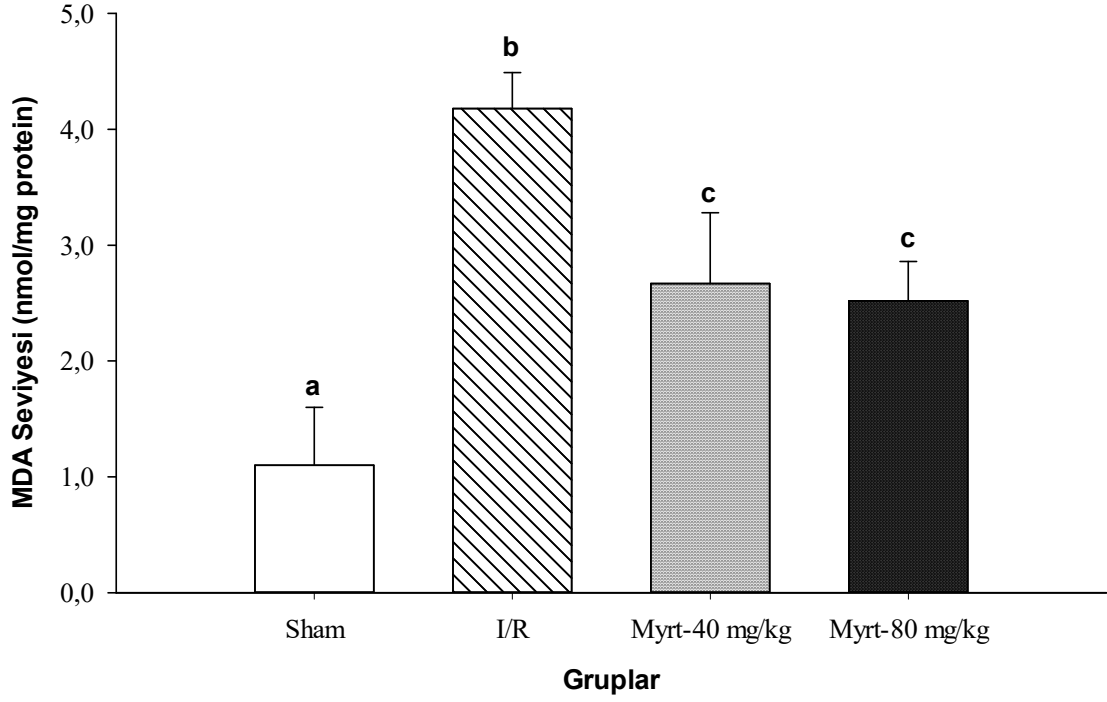
Grupların böbrek dokusunda yapılan GSH analizinin sonuçları Şekil 4.13.'de verilmiştir. GSH seviyesinde sham grubuna göre I/R grubunda belirgin azalma görüldü ($p<0.05$). Myrt-40 ve Myrt-80 gruplarının GSH seviyesinde ise I/R grubuna oranla önemli ölçüde artış olduğu belirlendi ($p<0.05$).



Şekil 4. 13. Deney ve uygulama gruplarının GSH seviyesi (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir ^{a,b,c} $p<0.05$)

4.10. Myrt'nin MDA Seviyesi Üzerine Etkileri

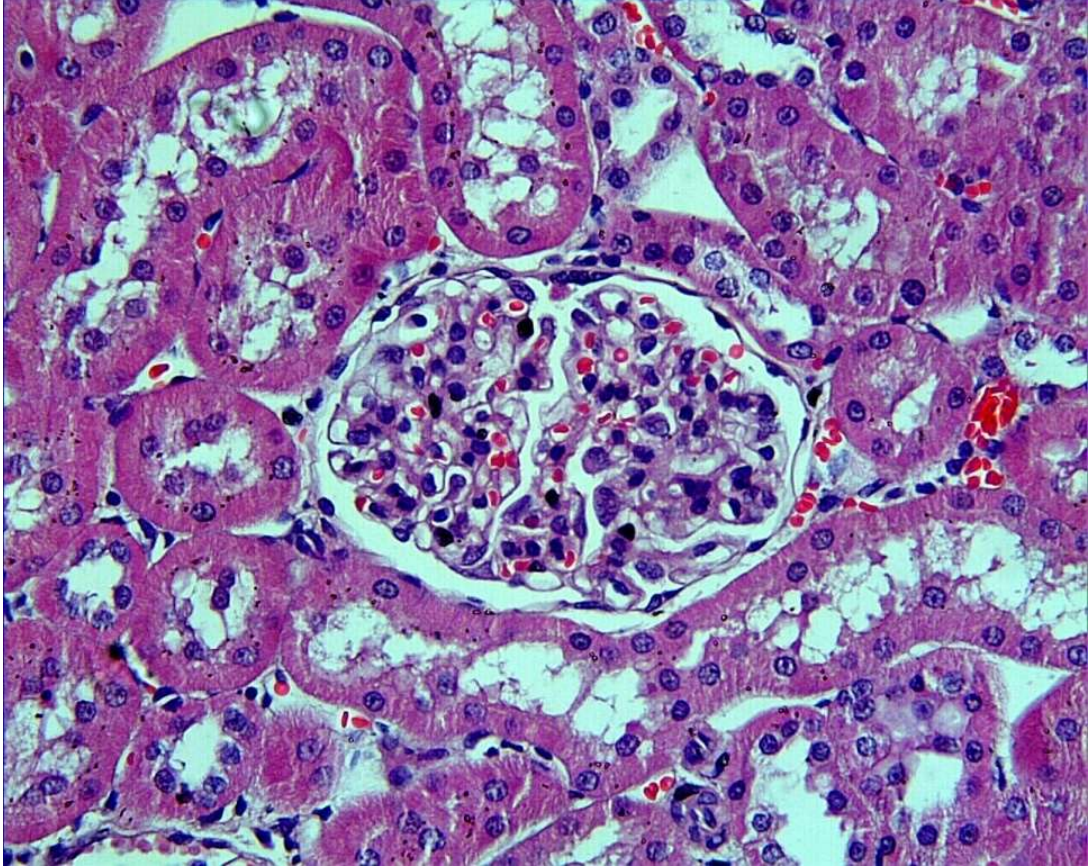
Myrt'nin, MDA seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.14.'de gösterilmiştir. I/R grubunda sham grubuna kıyasla MDA seviyelerinde artış görüldü ($p<0.05$). Myrt uygulama gruplarının MDA seviyesi, I/R grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı görüldü ($p<0.05$).



Şekil 4. 14. Deney ve uygulama gruplarının MDA seviyeleri (Farklı harfler gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir a,b,cp<0.05)

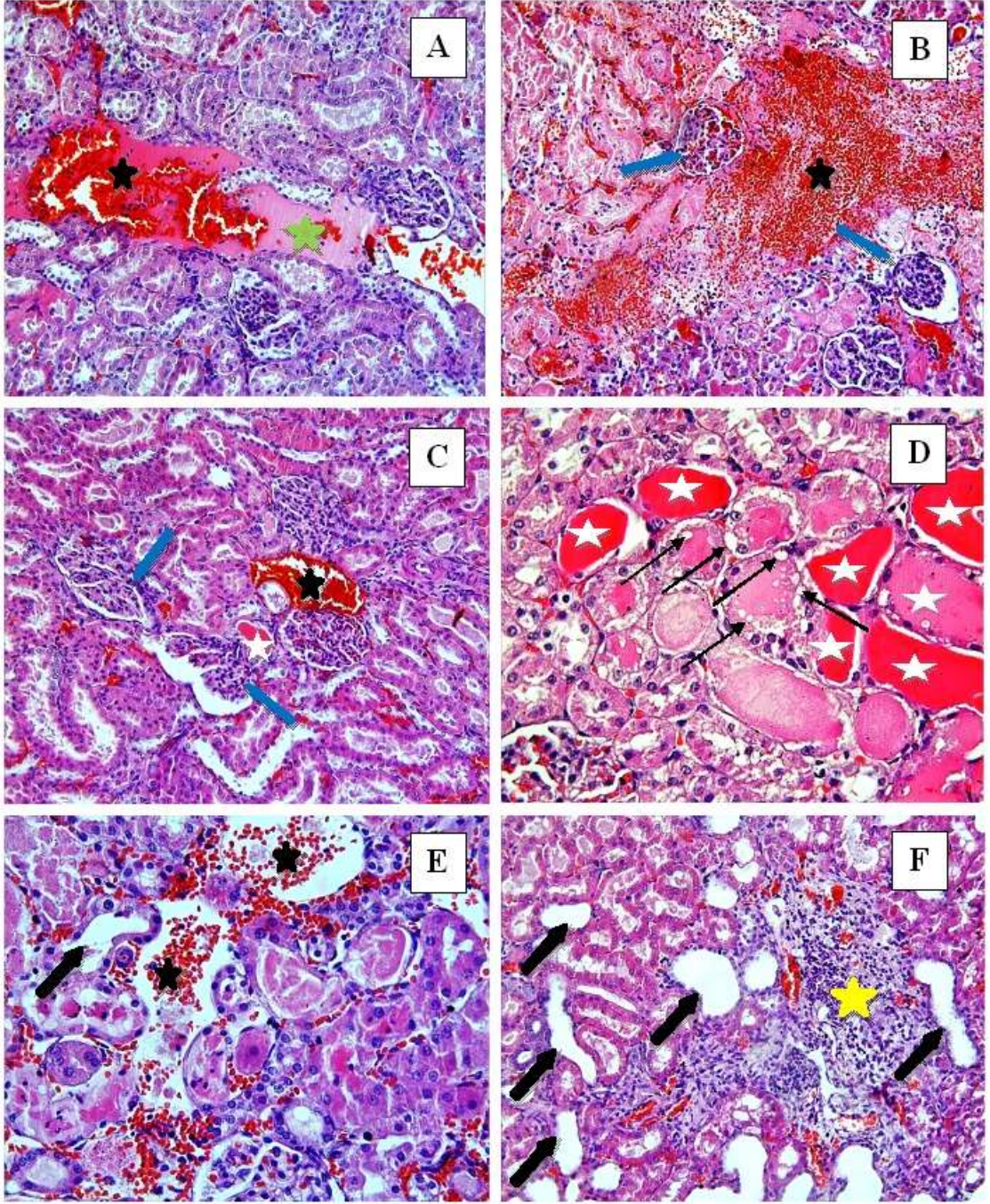
4.11. Histopatolojik Analizler

Hematoksilen-eozin boyama metodu uygulanan böbrek kesitlerinde sham grubunun korteksinde yer alan glomerül ve tübül yapıları normal histolojik yapıda olduğu görüldü.



Şekil 4. 15. Sham grubuna ait böbrek dokusunun histolojik kesiti. glomerul (yıldız) ve tübül yapıları (oklar) normal olarak izlenmekte (A) H-E; X20, (B) H-E; X40.

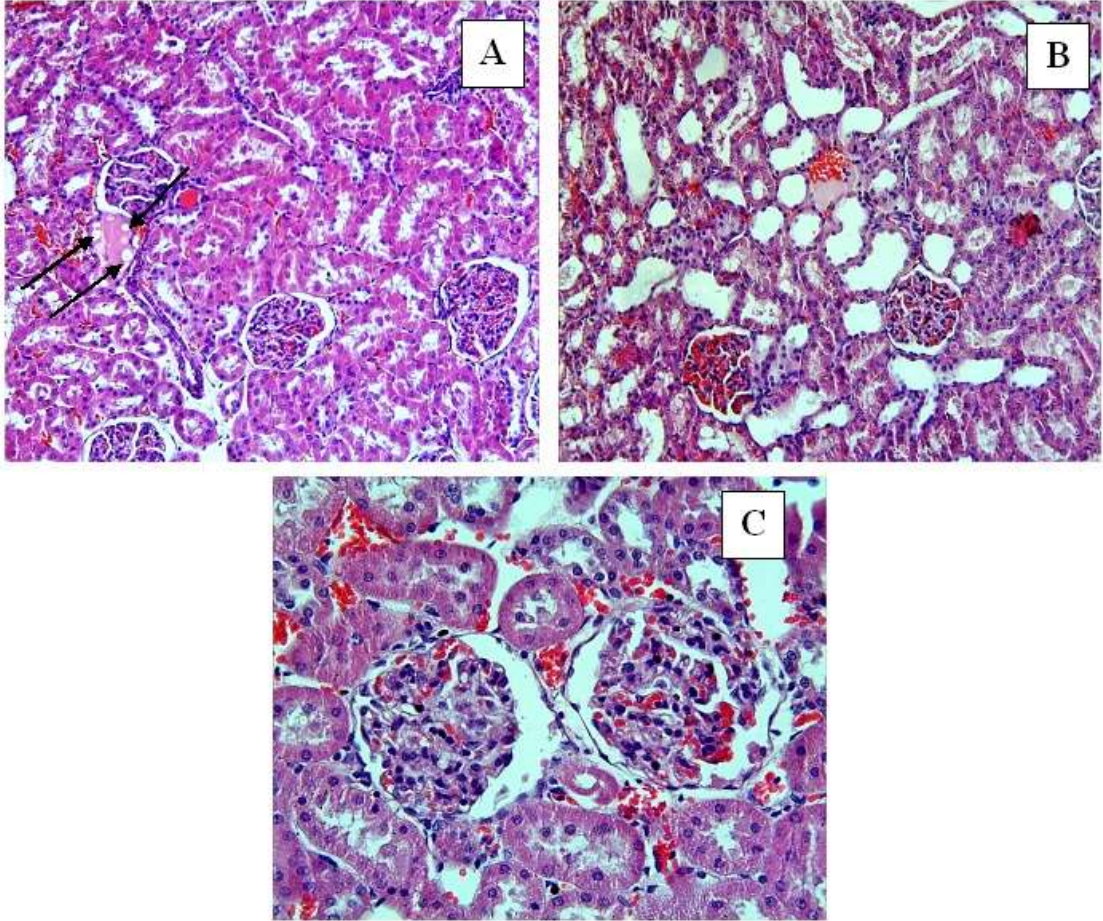
I/R grubunda böbrek kesitlerinde histopatolojik değişiklikler ve belirgin yaralanma görüldü. Bu değişiklikler kanama (siyah yıldızlar) (Şekil 4.16.A,B,C,E), tübüler lümenin dilatasyonu (kalın siyah oklar) (Şekil 4.16.E,F), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (sarı yıldızlar) (Şekil 4.16.E), ödem (Şekil 4.16.E) idi. yeşil yıldızlar (Şekil 4.16.A), tübüllerde epitel atrofisi ve hücre dökülmesi (Şekil 4.16.B,D,E,F), tübüler epitel hücrelerinin vakuolizasyonu (ince siyah oklar) (Şekil 4.16.D) ve tübüler lümendeki dökümler (Şekil 4.16.C, 4.16.D) olarak gözlemlendi. Tüm tedavi grupları (Myrt-40mg/kg ve Myrt-80mg/kg), I/R grubuyla karşılaştırıldığında daha az böbrek hasarına sahipti.



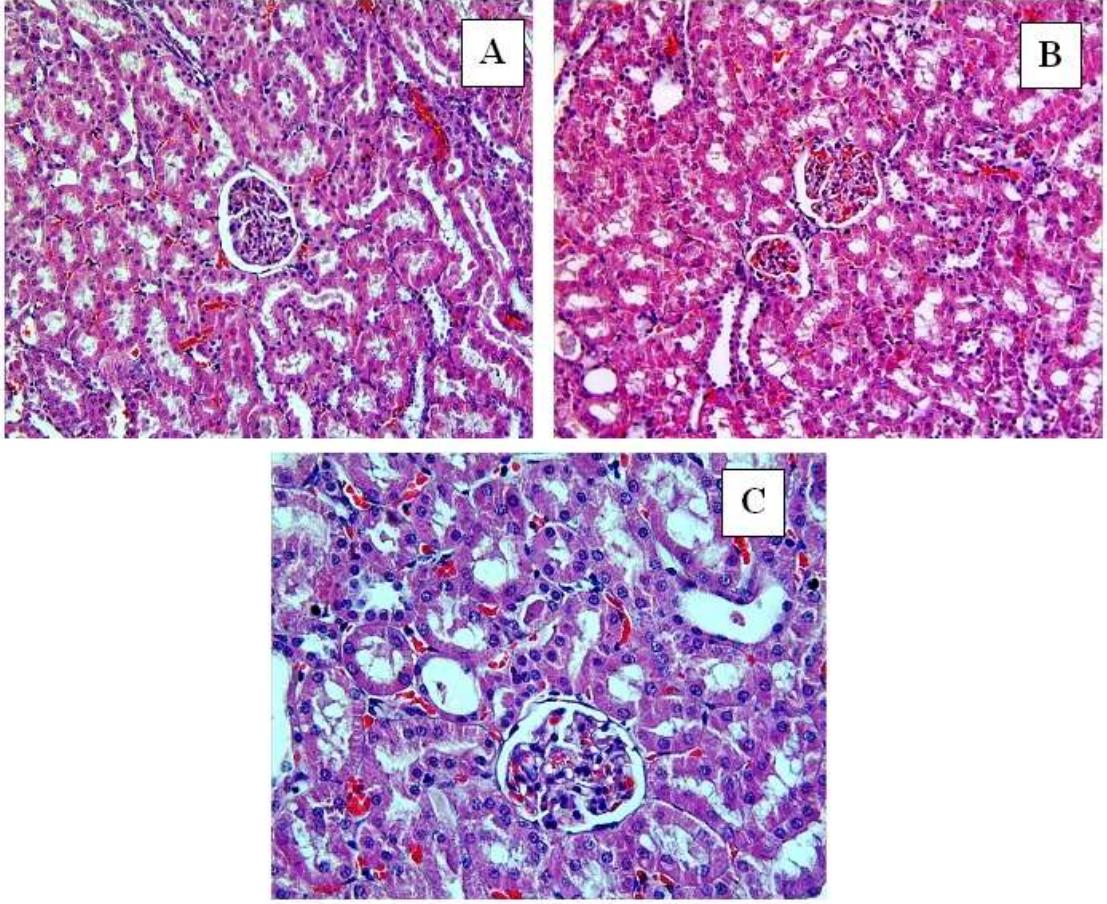
Şekil 4. 16. I/R grubuna ait böbrek dokusunun histolojik kesiti. Kanama (siyah yıldızlar) (A,B,C,E), tübüler lümende dilatasyon (kalın siyah oklar) (E,F), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (sarı yıldızlar) (E), ödem (A) (yeşil yıldızlar), tübüllerde epitel atrofisi ve hücre dökülmesi (B,D,E,F), tübüler epitel hücrelerinin vakuolizasyonu (ince siyah oklar) (D) ve tübüler lümendeki dökülmeler (beyaz yıldızlar) (C) ,D) gözlemlendi. A,B,C,F :H-E; X20, D,E: H-E; X40.

Myrt-40mg/kg grubunda az miktarda kanama (Şekil 4.17.A,B,C), vakuolizasyon (ince siyah oklar) (Şekil 4.17A), ödem (Şekil 4.17A, 4.17B) ve tübüler dilatasyon (Şekil 4.17A, 4.17B) gözlemlendi. Myrt-80mg/kg grubunda bir miktar kanama ve tübüler dilatasyon gözlemlendi (Şekil 4.18A, 4.18B, 4.18C).

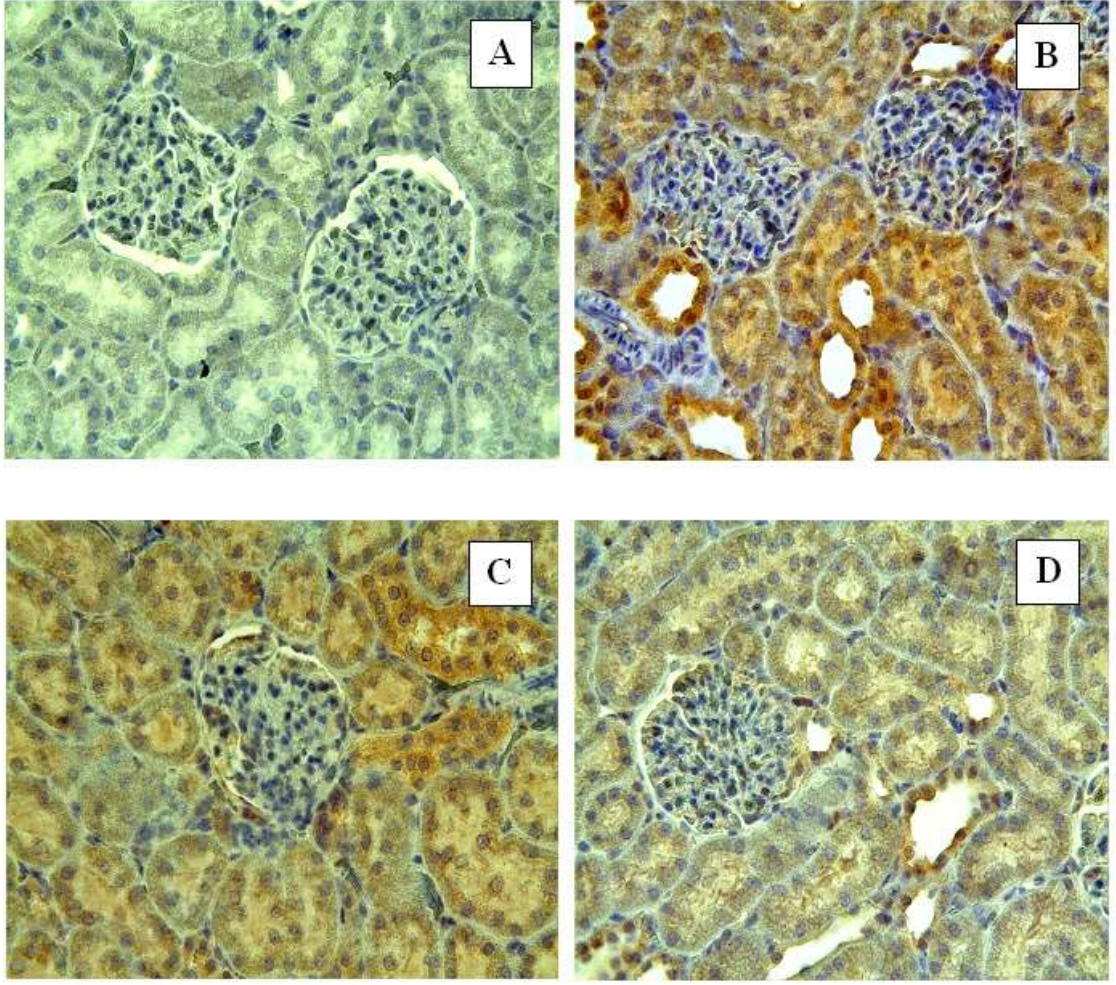
Sham grubunda immünohistokimyasal olarak Kaspaz-3 pozitif boyalı hücrelere rastlanmadı (Şekil 4.19A). I/R grubunda Kaspaz-3 pozitif hücre sayısı yüksekti (Şekil 4.19B). İmmünohistokimyasal olarak Kaspaz-3 pozitif boyalı hücrelerin oranı, Myrt-40mg/kg grubunda (Şekil 4.19C) ve Myrt-80mg/kg grubunda (Şekil 4.19D) I/R grubuyla karşılaştırıldığında minimum düzeydeydi. Myrt-80mg/kg grup ile Myrt-40mg/kg gruplarını karşılaştırdığımızda Kaspaz-3 pozitif boyalı hücrelerin Myrt-80mg/kg grubunda, Myrt-40mg/kg grubuna göre anlamlı derecede azaldığını tespit ettik.



Şekil 4. 17. Myrt-40mg/kg grubuna ait böbrek dokusunun histolojik kesiti. Bu grupta az miktarda kanama (A, B, C), vakuolizasyon (ince siyah oklar) (A), ödem (A, B) ve tübüler dilatasyon (A, B) gözlemlendi. A,B:H-E; X20, C:H-E; X40



Şekil 4. 18. Myrt-80mg/kg grubuna ait böbrek dokusunun histolojik kesiti. Hasarlar I/R grubuna göre anlamlı derecede azaldı. Tübüllerin ve glomerüllerin histolojik görünümünün iyileştiğini tespit ettik. Bu grupta bir miktar kanama ve tübüler dilatasyon gözlemlendi. A,B:H-E; X20,C:H-E; X40.



Şekil 4. 19. Böbrek kesitlerinde Kaspaz-3'ün immünohistokimyasal boyanması. (Sham (A), I/R grubu (B), Myrt-40mg/kg (C), Myrt-80mg/kg (D)). Sham grubunda Kaspaz-3 pozitif boyalı hücreler görülmedi. Kaspaz-3 pozitif boyalı hücrelerin oranı, Myrt-40mg/kg grubunda ve Myrt-80mg/kg grubunda I/R grubuyla karşılaştırıldığında minimum düzeydeydi. Myrt-80mg/kg grubunda pozitif boyalı hücreler, Myrt-40mg/kg grubuna kıyasla önemli ölçüde azdı A, B, C, D: Kaspaz-3; X 40.

Tablo 4. 1. Grupların histopatolojik hasar skorlaması (^{a,b,c,d}p<0.05)

Gruplar	Histopatolojik Hasar (Mean±SD)
Sham	0,43 ± 0,08 ^a
I/R	2,23 ± 0,10 ^b
Myrt-40mg/kg	1,50 ± 0,13 ^c
Myrt-80mg/kg	1,17 ± 0,07 ^d

5. TARTIŞMA

I/R hasarı iskemik olan dokulara kan akışının yeniden sağlanmasının ardından hücresel işlev bozukluğu ve ölümüyle karakterize patolojik bir olaydır. Kan akışının yeniden sağlanması iskemik dokuların kurtarılması için esastır. Ancak reperfüzyonun kendisi paradoksal olarak daha fazla hasara neden olarak organın işlevini ve canlılığını tehdit eder (192). Renal I/R hasarı ABH'nin yaygın bir nedeni olarak kabul edilmekte ve özellikle yoğun bakım hastaları ile majör cerrahi operasyon geçiren bireylerde önemli morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır (193).

Renal I/R hasarının önemli morbidite ve mortaliteye neden olmasının arkasındaki mekanizmalar arasında, oksidatif stres, inflamasyon, hücresel apoptoz, endotelial disfonksiyon ve vazokonstriksiyon gibi faktörler bulunmaktadır (194). Bu hasarın patofizyolojik süreci son derece karmaşıktır, ancak oksidatif stresin, apoptoz ve inflamasyon gibi bir dizi yıkıcı kaskadı tetiklediği bilinmektedir (191).

Oksidatif stres patofizyolojisinde, reperfüzyon süreciyle birlikte moleküler oksijenin hücrelere geri dönüşü endojen biyolojik sistemlerde çeşitli enzimatik reaksiyonların tetiklenmesine yol açar. Bu kapsamda özellikle NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve mitokondriyal elektron taşıma zinciri gibi mekanizmalar, moleküler oksijenin kullanılmasıyla birlikte ROS olarak bilinen serbest radikallerin büyük miktarlarda üretilmesine sebep olabilir (195, 196).

ROS'lar, hücre içinde oksidatif stres oluşturarak hücre zarları, proteinler ve nükleik asitler gibi hücresel bileşenlere zarar verebilirler (197). Bu durum, özellikle hücresel zararın artmasına neden olan lipid peroksidasyon ürünü olan MDA salınımını artırır (198). Renal dokuda, ROS'a karşı korunmak amacıyla tüm hücreler aktif olarak GSHx, CAT, SOD gibi endojen radikal süpürücüleri içeren antioksidan enzimleri salgırlar (45). Ancak, I/R sırasında antioksidanların hasara karşı koyma yeteneği azalır. Artan ROS üretimiyle birlikte antioksidan sistemdeki dengesizlik, hücresel redoks homeostazının bozulmasına ve dolayısıyla hücre hasarının artmasına yol açar (199). Meydana gelen hücre oksidasyonu, protein ve zar lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre ölümünü tetikler ve DNA çift sarmal yapısının bozulmasına neden olarak apoptozisi tetikleyebilir. Aynı anda reperfüzyon süreciyle nekrotik hücre artışı inflamatuvar yanıtı tetikler ve doku hasarının daha da şiddetlenmesine yol açar (200, 201).

Böbrek İ/R hasarını hafifletmek ve böbrek fonksiyonlarını iyileştirmek amacıyla çeşitli stratejiler ve klinik tedavi yöntemleri araştırılmıştır. Ancak, şu ana kadar gerçekleştirilen çalışmalarda, hiçbirisi hasarı tam anlamıyla ortadan kaldırma başarısı gösterememiştir (202, 203). Bu bağlamda, devam eden birçok araştırma, doğal antioksidanların kullanımını, çeşitli organlarda İ/R hasarına karşı etkili bir strateji olarak değerlendirmeye odaklanmıştır (141, 204, 205).

Bu kapsamda farmakolojik açıdan umut verici bir aktör, birçok bitkinin uçucu yağlarında yaygın olarak bulunan fitokimyasallar grubuna ait olan monoterpenlerdir (141). Özellikle, Myrt; okaliptüs, nane, biber ve kimyon gibi birçok bitki türünün uçucu yağlarında bulunan öne çıkan monoterpen çeşitlerinden biridir (19). Birkaç rapor Myrt'nin preklinik olarak; antinosiseptif (170), antikanser (166, 206), antihiperglisemik (167, 169, 207), nöroprotektan (157, 177), anti inflamatuvar ve antioksidan (155) özelliklere sahip olduğunu doğrulamıştır.

Çok sayıda araştırma, Myrt'nin özellikle antioksidan etkisi aracılığıyla çeşitli organ hasarlarını önleyebileceğini göstermiştir. Örneğin Parkinson Hastalığı modeli oluşturulan sıçanlarda Myrt uygulanmasının beyindeki lipid peroksidasyonunu (MDA) azaltmış ve davranışsal testlerde belirgin iyileşmeye neden olmuştur (157). Demanslı farelerde yapılan bir çalışmada, Myrt uygulamasının uzamsal hafıza bozukluğu ve anksiyeteyi düzelten olumlu etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Myrt'nin etkisini, endojen antioksidan sistem aktivitesini arttırarak (SOD, GSHx, CAT) beyni oksido-inflamatuvar stresten korumasına atfedilmiştir (156). Benzer şekilde, farelerde elektromanyetik radyasyona maruz kalma sonrasında Myrt uygulanmasının hafıza süreçlerinde iyileşmeye yol açtığı bildirilmiştir. Bu etkinin Myrt'nin, antioksidan enzim sistemini canlı tutmasından kaynaklandığı öne sürülmektedir (158). Ayrıca, sıçanlarda mesane kanseri modelinde Myrt uygulamasının MDA seviyelerini düşürdüğü belirtilmiştir (166). Çalışmamızda, benzer doz ve sürede uygulanan Myrt'nin ise sıçanlarda skopolamin ile indüklenen demans modelinde beyinde artan MDA seviyesini baskıladığı gösterilmiştir (177).

Myrt'nin deneysel hastalık modellerinde sergilediği antioksidatif etki bu doğal bileşiğin renoprotektif etkilerinin değerlendirilmesini destekleyen önemli bir bilimsel temel sağlamıştır. Çalışmamız kapsamında, böbrek I/R hasarının hücresel düzeydeki etkilerini analiz ettik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, I/R hasarı böbrek dokusunda MDA seviyelerinde anlamlı bir artışa, antioksidan enzimler olan SOD, CAT aktivitesi ile GSH seviyelerinde ise belirgin bir azalmaya neden olmuştur ($p<0.05$). Elde edilen bu bulgular,

literatürde I/R hasarının tanımladığı değişikliklerle uyumludur ve deneysel renal I/R modelinin sıçanlarda başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızda intraperitoneal olarak uygulanan 40 ve 80 mg/kg dozlarındaki Myrt'nin I/R hasarlı böbrek dokusunda MDA seviyelerini azalttığını ve SOD ve CAT aktivitesi ile GSH seviyelerini arttırdığını tespit ettik. Bu bulgular, Myrt'nin renoprotektif etkilerini destekleyerek, I/R hasarına karşı koruyucu bir strateji olarak değerlendirilmesini sağlayabilecektir.

Literatürdeki ve çalışmamızdaki etkilerin ortaya çıkmasında Myrt'nin kimyasal etkileri aracı olmuş olabilir. Myrt'nin başlıca etkilerinden biri, bir lipit molekülü olarak membranları stabilize edici bir etkiye sahip olmasıdır. Bu stabilizasyon, yapısal olarak sağlam ve işlevsel hücre veya organel membranlarının inşa ve korunmasını destekleyebilir (165, 166). Ayrıca, Myrt gibi bisiklik monoterpenoidler, içerdikleri çift bağlar aracılığıyla ROS ile reaksiyona girerek onları nötralize edebilir. Bu özellikleri sayesinde, serbest radikallerin hücrelere zarar vermesini önleme veya azaltma potansiyeline sahiptirler (208-210). Böylece hücrelerin oksidatif stresten kaynaklanan hasara karşı korunmasına katkı sağlar.

Renal I/R sonrasında artan ROS üretimi, nekrotik hücre sayısındaki artışa ve hasarlı böbreklerdeki inflamasyona önemli katkıda bulunan bir faktör olarak tanımlanmıştır. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B); TNF- α , IL-1 β , C-reaktif protein ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar aracılardan oluşumundan sorumlu pro-inflamatuvar bir sinyal molekülüdür (211). TNF- α , süperoksit aktivitesini artırma eğiliminde olup, aynı zamanda nitrik oksit aktivitesini azaltarak renal vazokonstriksiyon ve hipofiltrasyona neden olarak ABH patofizyolojisini olumsuz yönde etkiler (212). IL-1 β ise iskemik hasarı takiben nötrofil infiltrasyonunu artırır (213). Böylece bu sitokinler, tübüler hücrelerde inflamasyona katkıda bulunur ve böbrek hasarını daha da artırır (214). Dolayısıyla NF- κ B sinyal yolağını etkileyen ve TNF- α ile IL-1 β gibi sitokinleri hedef alan anti-inflamatuvar özelliklere sahip bileşiklerin böbrek I/R hasarını azaltabileceği bildirilmektedir (215).

Çalışmamızda, Myrt ön tedavisi serum ve böbrek dokusunda proinflamatuvar sitokin (TNF- α ve IL-1 β) seviyelerini azaltmıştır; bu da renal I/R hasarına karşı myrtenalin immünomodülatör özelliğinden kaynaklanmış olabilir. Bulgularımızı destekleyen önceki çalışmalarda, Myrt uygulamasının in vitro koşullarda artmış TNF- α ve IL-1 β aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (160). Ayrıca, Diabetes Mellitus oluşturulan sıçanlarda Myrt uygulamasının karaciğer ve pankreas dokusunda artan NF-

κ B, TNF- α ve IL-1 β m-RNA ve protein seviyelerini azalttığı rapor edilmiştir (155). Demanslı fareler üzerinde yapılan bir araştırmada ise Myrt kullanımının uzamsal hafıza problemlerini ve anksiyeteyi düzelttiği belirlenmiştir. Bu etki, beyini oksido-enflamatuar stresten koruma eğiliminde olan endojen antioksidan sistemi güçlendirmeye bağlanmıştır (156). Yüksek yağlı diyetle ateroskleroz oluşturulan sıçanlarda Myrt uygulaması artan inflammatuar parametrelerin (IL-1 β , IL-6) seviyesini azaltmıştır (154).

Çalışmamızda, her ne kadar NF- κ B seviyesini ölçme imkanımız olmasa da, aşağı akış yolağındaki TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin Myrt uygulamasına bağlı olarak düşmesi, literatürle uyumlu bir şekilde gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız, Myrt'nin antioksidan etkisine ek olarak anti-inflamatuar bir aktiviteye sahip olduğunu desteklemektedir. Bu durum, Myrt'nin renal I/R kaynaklı inflamasyonu etkili bir şekilde baskılayabildiğini göstermektedir

Renal I/R'de oksidan-antioksidan dengesizlik yaşanır. Bu dengesizlik sonucu artan ROS, DNA hasarına yol açarak apoptotik süreci başlatabilir (199, 216). Apoptozu teşvik eden transmembran proteinler mitokondriyal zarlar arası boşluktan sitoplazmaya salınır. DNA parçalanması, apoptotik değişikliklerine neden olan bir dizi kaspazı aktive ederek apoptozom oluşumuna neden olur (49, 50). Apoptozom oluşumu, kaspaz-9'un otokatalitik aktivasyonuna neden olur. Bu da “cellat” kaspazların (kaspaz-3 gibi) proteolitik aktivasyonunu teşvik eder. Böylece programlanmış hücre ölümünün geri dönüşümsüz fazı başlar (51).

Apoptozun renal IR hasarının patolojik süreciyle yakından ilişkili olduğunu gösteren araştırmalar mevcuttur (217) Çalışmamızda, böbrek dokusunda kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayısının I/R grubunda Sham grubuna kıyasla arttığı, Myrt uygulanan gruplarda ise kaspaz-3 immunreaktivitesinin I/R grubuna kıyasla doza bağımlı olarak önemli ölçüde azaldığını tespit ettik. Bu bulgu, önceki çalışmalarda Myrt'in apoptotik parametreleri azaltıcı etkisini desteklemektedir (218). Ancak; Farrag ve ark. tarafından oluşturulan mesane kanseri modelinde myrtenalin etkilerinin incelendiği bir çalışmada 80 mg/kg dozda Myrt uygulanmasının mesane dokusunda kaspaz-3 aktivitesini upregüle ederek pro-apoptotik bir etki göstermiştir (166). Kanser hücrelerinde pro-apoptotik etki sergileyen faktörler veya bileşiklerin, normal hücrelerde anti-apoptotik etki gösterdiği durumlar, hücresel sinyal yollarındaki karmaşık düzenlemelerin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Bu fenomen, genellikle hücre tipine, genetik özelliklere ve hücrenin mevcut durumuna bağlı olarak değişkenlik gösterir (219). Kanser hücrelerine özgü pro-apoptotik etki gösteren bir ajanın, normal hücrelerde anti-apoptotik etkiye sahip

olması, hücresel düzenleme sistemlerinin farklılığını gösteren önemli bir konu olarak değerlendirilmektedir (220).

Araştırmamız kapsamında, sıçan böbrekleri histopatolojik değerlendirmeye de tabi tutulmuştur. Renal I/R hasarı, böbrek kan akışında değişikliklere yol böbrek damarlarının tepkisel özelliklerle mikrovasküler hasar ve değişikliklere neden olur. Bu süreç, glomerüler ve tübüler epitel hücre hasarını, inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve apoptozu da beraberinde getirmektedir (221). Çalışmamızın sonuçlarında I/R grubundaki hayvanların böbrek kesitlerinde belirgin histopatolojik değişiklikler ve ciddi yaralanmalar gözlenmiştir. Bu değişiklikler arasında glomerüller arasında belirgin kanama, tübüler lümenin dilatasyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem, tübüllerde epitel atrofisi, hücre dökülmesi ve tübüler epitel hücrelerinin vakuolizasyonu yer almaktadır. Düşük ve yüksek doz Myrt uygulamasının ardından sıçanların böbrek hasarının I/R grubuna göre belirgin şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Yüksek ve düşük doz Myrt arasında histolojik hasarın giderilmesi açısından anlamlı bir etki olduğu belirlenmiştir. Bitkilerde, Myrt metabolik olarak α -pinen ile ilişkilidir. α -pinen myrtenol'e metabolize olur ve daha sonra myrtenal'e dönüşür. Bulgularımızı destekleyecek şekilde Myrt ile ilişkili bu bileşiklerin histopatolojik böbrek değişiklikleri üzerinde olumlu etkileri bildirilmiştir (222, 223).

Renal I/R hasarı sırasında böbreklerde meydana gelen patolojik süreç serum BUN ve kreatininde artışa neden olur (224). Klinik olarak serum kreatinin seviyesindeki artış, akut böbrek hasarını tanılamak için geleneksel olarak kullanılan bir belirteçtir (225). Ancak geleneksel bir belirteç olmasına rağmen kreatinin ve BUN, ABH'nin erken dönemlerinde duyarlı bir parametre değildir. NGAL ve KIM-1 gibi moleküller ise böbrek hasarını erken ve hassas bir şekilde belirlemek için kullanılan biyobelirteçlerdir. Her iki belirteç de proksimal tübül hücrelerinde üretilir ve böbrek hasarına yanıt olarak seviyeleri artar (111). Mishra ve ark. renal I/R'ye maruz bırakılan farelerde, NGAL'ın iskemiye takip eden 2 saat içerisinde idrarda kolayca tespit edildiği belirlemiştir (226, 227). KIM-1'in ise sağlıklı sıçan böbreklerinde eksprese edilmediği ancak iskemi sonrası böbreklerde çarpıcı şekilde eksprese edildiği gösterilmiştir (228). Bu sebeple KIM-1 ve NGAL böbrek tübüler hücrelerindeki hasarı daha hassas bir şekilde yansıtarak, ABH'nin erken aşamalarında tespitini mümkün kılar. Bu biyobelirteçlerin klinik uygulama ve değerlendirme süreçleri hala devam etmekle birlikte, böbrek hasarının daha hızlı ve etkili bir şekilde belirlenmesinde önemli parametrelerdir (229).

Çalışmamızda BUN, kreatinin, KIM-1 ve NGAL seviyelerinin I/R gruplarında sham grubuna kıyasla artış göstermesi, renal I/R hasarının belirgin bir şekilde ortaya çıkışını yansıtmaktadır. Myrt ön tedavisi, serum kreatinin, BUN ve KIM-1 ile NGAL seviyelerindeki azalma ile doğrulandığı üzere renal glomerüler filtrasyon fonksiyonunu iyileştirmiştir. Bu bulgular, Myrt'nin potansiyel bir renoprotektif ajan olarak değerlendirilmesini desteklemektedir.



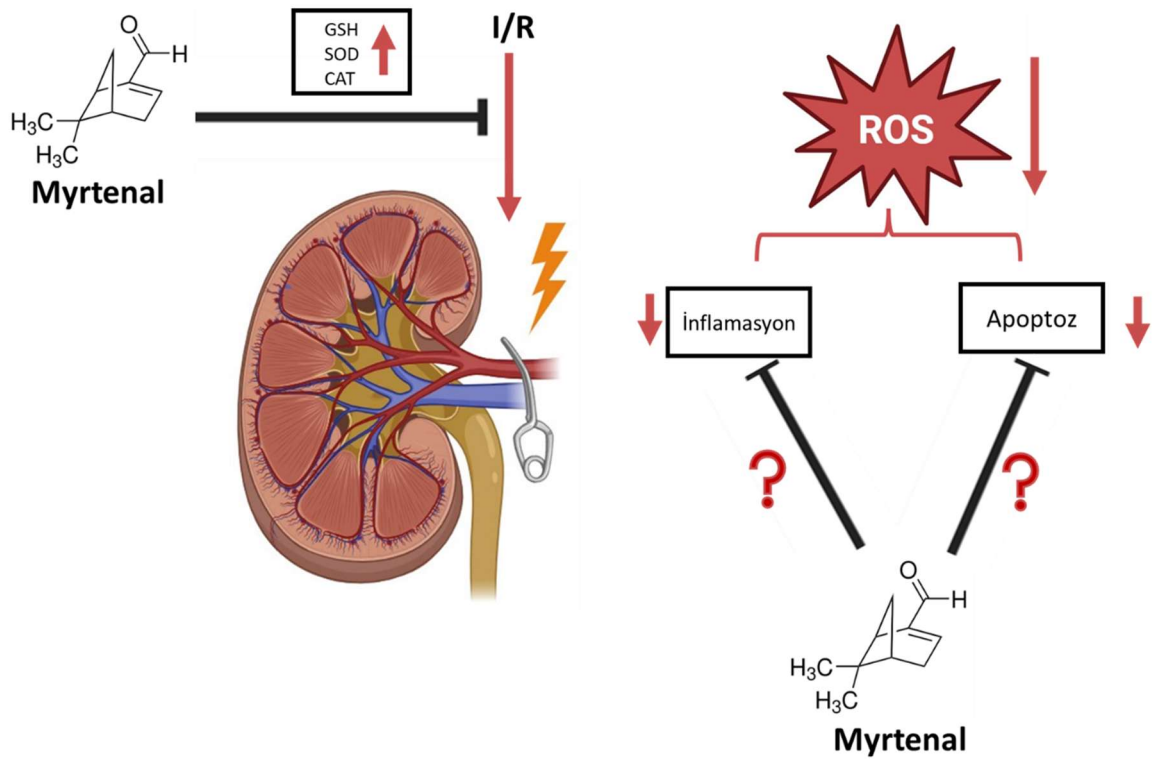
6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez araştırması kapsamında, doğal bir monoterpen çeşidi olan Myrt'nin, deneysel olarak oluşturulan renal I/R hasarı üzerindeki koruyucu etkileri biyokimyasal ve histolojik analizlerle değerlendirilmiştir. Bu çalışma, Myrt ön tedavisinin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri aracılığıyla renal I/R'nin neden olduğu ABH üzerinde olumlu etkilerini göstermektedir. Elde edilen bulgularımız, literatürde daha önce yer almamış olup, Myrt'nin I/R hasarına karşı renoprotektif potansiyelini ortaya koymaktadır.

Elde edilen tutarlı biyokimyasal ve histopatolojik bulgular, Myrt'ın renal I/R kaynaklı akut böbrek hasarını azaltmada etkili bir şekilde oksidatif stresi düzenlediğini göstermektedir. Bu koruyucu etkiler, aşağıdaki mekanizmalar aracılığıyla muhtemel olarak gerçekleşmiştir:

1. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların artışı,
2. Lipid peroksidasyonunda azalma
3. TNF-a, IL-6 gibi pro-inflamatuvar belirteçlerin seviyesinin azalması
4. Kaspaz-3 gibi apoptotik parametrelerin seviyesini azaltması

Bu kapsamda, Myrt'ın renal I/R hasarı üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendiren çalışmada gözlemlenen etkilerin, Myrt'ın sadece antioksidan özelliklerinden mi kaynaklandığı yoksa apoptozu ve inflamasyonu azaltmada başka mekanizmaların da etkili olup olmadığı konusunda net bir bilgi sunulamamaktadır. Bu noktada, Şekil 6.1'de soru işareti ile gösterilen boşlukların, Myrt'ın moleküler etki mekanizmalarını aydınlatmak amacıyla yapılacak ileri düzey çalışmalarla doldurulması gerekmektedir.



Şekil 6.1. Çalışmada gözlemlenen etkiler ve boşluklar

KAYNAKLAR

1. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2016;37(2):85-98.
2. Mandai S, Ando F, Mori T, Susa K, Iimori S, Naito S, et al. Burden of kidney disease on the discrepancy between reasons for hospital admission and death: An observational cohort study. *PLoS One*. 2021;16(11):e0258846.
3. Kung C-W, Chou Y-H. Acute kidney disease: an overview of the epidemiology, pathophysiology, and management. *Kidney Research and Clinical Practice*. 2023;42(6):686.
4. Hundemer GL, Srivastava A, Jacob KA, Krishnasamudram N, Ahmed S, Boerger E, et al. Acute kidney injury in renal transplant recipients undergoing cardiac surgery. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2021;36(1):185-96.
5. Andonovic M, Traynor JP, Shaw M, Sim MAB, Mark PB, Puxty KA. Short-and long-term outcomes of intensive care patients with acute kidney disease. *EClinicalMedicine*. 2022;44.
6. Saxena A, Meshram SV. Predictors of Mortality in Acute Kidney Injury Patients Admitted to Medicine Intensive Care Unit in a Rural Tertiary Care Hospital. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 2018;22(4):231-37.
7. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev*. 2015;4(2):20-7.
8. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*. 2015;6:524-51.
9. Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskalyeva B, Abdull Razis AF, Modu B, et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: Potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers In Chemistry*. 2023;11:1158198.
10. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016;1863(12):2977-92.
11. de Lima WV, Visona I, Schor N, Almeida WS. Preconditioning by aerobic exercise reduces acute ischemic renal injury in rats. *Physiological Reports*. 2019;7(14):e14176.

12. Zhang M, Liu Q, Meng H, Duan H, Liu X, Wu J, et al. Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024;9(1):12.
13. Cantero-Navarro E, Rayego-Mateos S, Orejudo M, Tejedor-Santamaria L, Tejera-Muñoz A, Sanz AB, et al. Role of macrophages and related cytokines in kidney disease. *Frontiers In Medicine*. 2021;8:688060.
14. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal Of Clinical Investigation*. 2011;121(11):4210-21.
15. Gameiro J, Fonseca JA, Outerelo C, Lopes JA. Acute Kidney Injury: From Diagnosis to Prevention and Treatment Strategies. *Journal Of Clinical Medicine*. 2020;9(6).
16. Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, et al. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *International Journal Of Molecular Sciences*. 2018;19(6).
17. Chiba Y, Sugiyama Y, Nishi N, Nonaka W, Murakami R, Ueno M. Sodium/glucose cotransporter 2 is expressed in choroid plexus epithelial cells and ependymal cells in human and mouse brains. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*. 2020;40(5):482-91.
18. Hari Babu L, Perumal S, Balasubramanian MP. Myrtenal, a natural monoterpene, down-regulates TNF- α expression and suppresses carcinogen-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular And Cellular Biochemistry*. 2012;369:183-93.
19. Dragomanova S, Tancheva L, Georgieva M. A review: Biological activity of myrtenal and some myrtenal-containing medicinal plant essential oils. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2018;5(2):22-33.
20. Soriano RM, Penfold D, Leslie SW. *Anatomy, abdomen and pelvis, kidneys*. 2018.
21. Guyton ACMD. *Text book of medical physiology*: China; 2006.
22. Bertram JF, Douglas-Denton RN, Diouf B, Hughson MD, Hoy WE. Human nephron number: implications for health and disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 2011;26(9):1529-33.
23. Ogobuiro I, Tuma F. *Physiology, Renal*. 2019.
24. Inker LA, Titan S. Measurement and Estimation of GFR for Use in Clinical Practice: Core Curriculum 2021. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2021;78(5):736-49.
25. Finco DR, Duncan JR. Evaluation of blood urea nitrogen and serum creatinine concentrations as indicators of renal dysfunction: a study of 111 cases and a review

- of related literature. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1976;168(7):593-601.
26. Post A, Tsikas D, Bakker SJL. Creatine is a Conditionally Essential Nutrient in Chronic Kidney Disease: A Hypothesis and Narrative Literature Review. *Nutrients*. 2019;11(5).
 27. Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Kashani K. Serum creatinine level, a surrogate of muscle mass, predicts mortality in critically ill patients. *Journal of Thoracic Disease*. 2016;8(5):E305-E11.
 28. Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders H-J. Acute kidney injury. *Nature Reviews Disease Primers*. 2021;7(1):1-17.
 29. Batte A, Shahrin L, Claure-Del Granado R, Luyckx VA, Conroy AL, editors. *Infections and acute kidney injury: a global perspective 2023*: Elsevier.
 30. Samoni S, De Rosa S, Ronco C, Castellano G. Update on persistent acute kidney injury in critical illnesses. *Clin Kidney J*. 2023;16(11):1813-23.
 31. Skarupskienė I, Adukauskienė D, Kuzminskienė J, Rimkutė L, Balčiuvienė V, Žiginskienė E, et al. Mortality prediction in patients with acute kidney injury requiring renal replacement therapy after cardiac surgery. *Medicina*. 2017;53(4):217-23.
 32. Kung CW, Chou YH. Acute kidney disease: an overview of the epidemiology, pathophysiology, and management. *Kidney Res Clin Pract*. 2023;42(6):686-99.
 33. Joshi M, Milmile R, Dhakane P, Bhosale SJ, Kulkarni AP. Incidence and Predictors of Acute Kidney Injury in Patients Undergoing Elective Hepatic Resection for Malignant Tumors: A 3-year Prospective Observational Study. *Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*. 2021;25(4):398-404.
 34. Dong Y, Zhang Q, Wen J, Chen T, He L, Wang Y, et al. Ischemic Duration and Frequency Determines AKI-to-CKD Progression Monitored by Dynamic Changes of Tubular Biomarkers in IRI Mice. *Frontiers In Physiology*. 2019;10:153.
 35. Gyurászová M, Gurecká R, Bábíčková J, Tóthová E. Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*. 2020;2020:5478708.
 36. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual Review Of Medicine*. 1991;42:225-46.

37. Kanagasundaram NS. Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury. *Annals Of Clinical Biochemistry*. 2015;52(Pt 2):193-205.
38. Onal A, Astarcioglu H, Ormen M, Atila K, Sarioglu S. [The beneficial effect of L-carnitine in rat renal ischemia-reperfusion injury]. *Ulusal Travma Ve Acil Cerrahi Dergisi = Turkish Journal Of Trauma & Emergency Surgery : TJTES*. 2004;10(3):160-7.
39. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review Of Cell And Molecular Biology*. 2012;298:229-317.
40. Kezic A, Stajic N, Thaiss F. Innate Immune Response in Kidney Ischemia/Reperfusion Injury: Potential Target for Therapy. *Journal Of Immunology Research*. 2017;2017:6305439.
41. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins Basic Pathology 2003.
42. Gagno G, Ferro F, Fluca AL, Janjusevic M, Rossi M, Sinagra G, et al. From Brain to Heart: Possible Role of Amyloid- β in Ischemic Heart Disease and Ischemia-Reperfusion Injury. *International Journal Of Molecular Sciences*. 2020;21(24):9655.
43. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biology*. 2015;6:524-51.
44. Afzal S, Abdul Manap AS, Attiq A, Albokhadaim I, Kandeel M, Alhojaily SM. From imbalance to impairment: the central role of reactive oxygen species in oxidative stress-induced disorders and therapeutic exploration. *Frontiers In Pharmacology*. 2023;14:1269581.
45. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*. 2010;4(8):118.
46. Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016;25(3):119-46.
47. Papaliagkas V, Anogianaki A, Anogianakis G, Ilonidis G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals. *Hippokratia*. 2007;11(3):108-13.
48. Lu H, Xie D, Qu B, Li M, He Y, Liu W. Emodin prevents renal ischemia-reperfusion injury via suppression of p53-mediated cell apoptosis based on network pharmacology. *Heliyon*. 2023;9(5).
49. Wang W, Wang Q, Yu W, Chen L, Li Z. Efficacy of phosphocreatine pre-administration on XIAP and Smac in ischemic penumbra of rats with focal cerebral ischemia reperfusion injury. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2018;33:117-24.

50. Tang Q, Ye T, Liang R, Wang Y, Li H, Zhang J, et al. Scalp Acupuncture and Treadmill Training Inhibits Neuronal Apoptosis through Activating cIAP1 in Cerebral Ischemia Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021;2021.
51. Dojo Soeandy C, Salmasi F, Latif M, Elia AJ, Suo NJ, Henderson JT. Endothelin-1-mediated cerebral ischemia in mice: early cellular events and the role of caspase-3. *Apoptosis*. 2019;24(7):578-95.
52. Zhang Y, Zhang Y, Jin X-f, Zhou X-h, Dong X-h, Yu W-t, et al. The role of astragaloside IV against cerebral ischemia/reperfusion injury: suppression of apoptosis via promotion of P62-LC3-autophagy. *Molecules*. 2019;24(9):1838.
53. Fernandes SM, Watanabe M, Vattimo MFF. Inflammation: improving understanding to prevent or ameliorate kidney diseases. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2021;27:e20200162.
54. Güler MC, Tanyeli A, Akdemir FNE, Eraslan E, Şebin SÖ, Erdoğan DG, et al. An Overview of Ischemia--Reperfusion Injury: Review on Oxidative Stress and Inflammatory Response. *Eurasian Journal of Medicine*. 2022;54.
55. Cantero-Navarro E, Rayego-Mateos S, Orejudo M, Tejedor-Santamaria L, Tejera-Muñoz A, Sanz AB, et al. Role of Macrophages and Related Cytokines in Kidney Disease. *Frontiers in medicine*. 2021;8:688060.
56. Xu X, Wu X, Yue G, An Q, Lou J, Yang X, et al. The role of Nod-like receptor protein 3 inflammasome activated by ion channels in multiple diseases. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2023;478(6):1397-410.
57. Trujillo-Rangel W, García-Valdés L, Méndez-Del Villar M, Castañeda-Arellano R, Totsuka-Sutto SE, García-Benavides L. Therapeutic Targets for Regulating Oxidative Damage Induced by Ischemia-Reperfusion Injury: A Study from a Pharmacological Perspective. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2022;2022:8624318.
58. Hofmann J, Pühringer M, Steinkellner S, Holl A-S, Meszaros AT, Schneeberger S, et al. Novel, Innovative Models to Study Ischemia/Reperfusion-Related Redox Damage in Organ Transplantation. *Antioxidants*. 2022;12(1):31.
59. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.

60. Tas Hekimoglu A, Toprak G, Akkoc H, Evliyaoglu O, Ozekinci S, Kelle I. Oxytocin ameliorates remote liver injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*. 2013;17(2):169-73.
61. Grisham MB, Granger DN. Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clinics in chest medicine*. 1989;10(1):71-81.
62. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England journal of medicine*. 1985;312(3):159-63.
63. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*. 1989;58:79-110.
64. Slater TF. Free radicals and tissue injury: fact and fiction. *The British journal of cancer Supplement*. 1987;8:5-10.
65. Amin EF, Rifaai RA, Abdel-latif RG. Empagliflozin attenuates transient cerebral ischemia/reperfusion injury in hyperglycemic rats via repressing oxidative-inflammatory-apoptotic pathway. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2020;34(5):548-58.
66. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(7):2064-89.
67. McCord JM. Oxygen-derived free radicals. *New horizons (Baltimore, Md)*. 1993;1(1):70-6.
68. Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain research Brain research protocols*. 1997;2(1):75-84.
69. Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Critical reviews in toxicology*. 2015;45(9):765-98.
70. Ghogare AA, Greer A. Using Singlet Oxygen to Synthesize Natural Products and Drugs. *Chemical reviews*. 2016;116(17):9994-10034.
71. Pourbagher-Shahri AM, Farkhondeh T, Talebi M, Kopustinskiene DM, Samarghandian S, Bernatoniene J. An Overview of NO Signaling Pathways in Aging. *Molecules*. 2021;26(15).

72. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(37):26464-72.
73. Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular aspects of medicine*. 1985;8(2):89-193.
74. Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric research*. 2009;66(2):121-7.
75. Zadak Z, Hyspler R, Ticha A, Hronek M, Fikrova P, Rathouska J, et al. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological research*. 2009;58 Suppl 1:S13-7.
76. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*. 1993;23(1):21-48.
77. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2006;160(1):1-40.
78. Savoure N. [Free radicals]. *Allergie et immunologie*. 1993;25(10):404-7.
79. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of toxicology*. 2012;2012:645460.
80. Rochette L, Dogon G, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. *International journal of molecular sciences*. 2022;24(1).
81. Di Nunzio M, Valli V, Bordoni A. PUFA and oxidative stress. Differential modulation of the cell response by DHA. *International journal of food sciences and nutrition*. 2016;67(7):834-43.
82. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British journal of pharmacology*. 2008;153(1):6-20.
83. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*. 2003;91 Spec No:179-94.
84. Yilmaz YF, Akbiyik F, Tuncel U, Unal A. [Lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with laryngeal carcinoma]. *Kulak burun bogaz ihtisas dergisi : KBB = Journal of ear, nose, and throat*. 2007;17(2):81-4.
85. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1996;36:83-106.

86. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. Annual review of biochemistry. 2017;86:715-48.
87. Huang G, Mei X, Hu J. The Antioxidant Activities of Natural Polysaccharides. Current drug targets. 2017;18(11):1296-300.
88. Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. Critical reviews in food science and nutrition. 2008;48(5):430-41.
89. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology. 2003;189(1-2):41-54.
90. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. Physiological measurement. 2007;28(4):R41-55.
91. Wang W, Xia MX, Chen J, Yuan R, Deng FN, Shen FF. Gene Expression Characteristics and Regulation Mechanisms of Superoxide Dismutase and Its Physiological Roles in Plants under Stress. Biochemistry Biokhimiia. 2016;81(5):465-80.
92. Kim S-H, Kim S-H, Lee J-H, Lee B-H, Yoon HJ, Shin DH, et al. Superoxide dismutase gene (SOD1, SOD2, and SOD3) polymorphisms and antituberculosis drug-induced hepatitis. Allergy, asthma & immunology research. 2015;7(1):88-91.
93. Anju A, Jeswin J, Thomas PC, Paulton MP, Vijayan KK. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cytoplasmic Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) from pearl oyster Pinctada fucata. Fish & shellfish immunology. 2013;34(3):946-50.
94. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 1999;37(9-10):949-62.
95. Peng P, Zou J, Zhong B, Zhang G, Zou X, Xie T. Protective Effects and Mechanisms of Flavonoids in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. Pharmacology. 2023;108(1):27-36.
96. Amir Aslani B, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. Life sciences. 2016;146:163-73.
97. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochemical pharmacology. 2002;64(5-6):1019-26.
98. Gathwala G, Aggarwal R. Selenium supplementation for the preterm Indian neonate. Indian journal of public health. 2016;60(2):142-4.

99. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*. 2007;2(2):219-36.
100. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. 2001;54(3):176-86.
101. Zhang L, Su P, Xu C, Chen C, Liang A, Du K, et al. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPAR γ expression and enhancing Runx2 expression. *Journal of Pineal Research*. 2010;49(4):364-72.
102. Lillig CH, Berndt C, Vergnolle O, Lönn ME, Hudemann C, Bill E, et al. Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(23):8168-73.
103. Jeong CH, Joo SH. Downregulation of Reactive Oxygen Species in Apoptosis. *Journal of cancer prevention*. 2016;21(1):13-20.
104. Rohr-Udilova NV, Stolze K, Sagmeister S, Nohl H, Schulte-Hermann R, Grasl-Kraupp B. Lipid hydroperoxides from processed dietary oils enhance growth of hepatocarcinoma cells. *Molecular nutrition & food research*. 2008;52(3):352-9.
105. Gille L, Nohl H. The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;375(2):347-54.
106. Smirnoff N, Wheeler GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2000;35(4):291-314.
107. Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1826(2):443-57.
108. Vitamin E. *Drugs and Lactation Database (LactMed)*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2006.
109. Tabidze LV, Kagan VE, Shukoliukov SA, Ivanov, II. [Is tocopherol a rhodopsin stabilizer in photoreceptor membranes?]. *Biofizika*. 1980;25(2):340-1.
110. Lane BR. Molecular markers of kidney injury. *Urologic oncology*. 2013;31(5):682-5.
111. Zdziechowska M, Gluba-Brzózka A, Poliwczak AR, Franczyk B, Kidawa M, Zielinska M, et al. Serum NGAL, KIM-1, IL-18, L-FABP: new biomarkers in the diagnostics of acute kidney injury (AKI) following invasive cardiology procedures. *International urology and nephrology*. 2020;52:2135-43.

112. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A, Group NM-aI. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *American journal of kidney diseases*. 2009;54(6):1012-24.
113. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268(14):10425-32.
114. Bundgaard JR, Sengelov H, Borregaard N, Kjeldsen L. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding NGAL: a lipocalin expressed in human neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;202(3):1468-75.
115. Le Cabec V, Calafat J, Borregaard N. Sorting of the specific granule protein, NGAL, during granulocytic maturation of HL-60 cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1997;89(6):2113-21.
116. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular cell*. 2002;10(5):1033-43.
117. Ronco C. NGAL: an emerging biomarker of acute kidney injury. *The International journal of artificial organs*. 2008;31(3):199-200.
118. Delanaye P, Rozet E, Krzesinski J-M, Cavalier E. Urinary NGAL measurement: biological variation and ratio to creatinine. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(3-4).
119. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003;14(10):2534-43.
120. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *The Lancet*. 2005;365(9466):1231-38.
121. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clinica chimica acta*. 2015;438:350-57.
122. Antonucci E, Lippi G, Ticinesi A, Pigna F, Guida L, Morelli I, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a promising biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury (AKI). *Acta Biomed*. 2014;85(3):289-94.

123. De Geus HRH, Ronco C, Haase M, Jacob L, Lewington A, Vincent J-L. The cardiac surgery-associated neutrophil gelatinase-associated lipocalin (CSA-NGAL) score: A potential tool to monitor acute tubular damage. Elsevier; 2016. p. 1476-81.
124. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(7):4135-42.
125. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney international*. 2002;62(1):237-44.
126. Chaturvedi S, Farmer T, Kapke GF. Assay validation for KIM-1: human urinary renal dysfunction biomarker. *International journal of biological sciences*. 2009;5(2):128.
127. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2006;290(2):F517-F29.
128. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. Oxford University Press; 2009. p. 3265-68.
129. Prozialeck WC, Edwards JR, Lamar PC, Liu J, Vaidya VS, Bonventre JV. Expression of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal tubule injury. *Toxicology and applied pharmacology*. 2009;238(3):306-14.
130. Coca SG, Yalavarth R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review. *Kidney international*. 2008;73(9):1008-16.
131. Zhang PL, Rothblum LI, Han WK, Blasick TM, Potdar S, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney international*. 2008;73(5):608-14.
132. Charlton JR, Portilla D, Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014;29(7):1301-11.
133. Inker LA, Okparavero A. Cystatin C as a marker of glomerular filtration rate: prospects and limitations. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2011;20(6):631-39.

134. Coll E, Botey A, Alvarez L, Poch E, Quintó L, Saurina A, et al. Serum cystatin C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *American journal of kidney diseases*. 2000;36(1):29-34.
135. Inker LA, Okparavero A. Cystatin C as a marker of glomerular filtration rate: prospects and limitations. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(6):631-9.
136. Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T, Martínez-Brú C, Grubb A. Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. *Clinical biochemistry*. 2005;38(1):1-8.
137. Deng Y, Wang L, Hou Y, Ma J, Chi R, Ye H, et al. The influence of glycemic status on the performance of cystatin C for acute kidney injury detection in the critically ill. *Renal failure*. 2019;41(1):139-49.
138. Dinarello CA. Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Seminars in nephrology*. 2007;27(1):98-114.
139. Dinarello CA. Interleukin-18. *Methods (San Diego, Calif)*. 1999;19(1):121-32.
140. Abarova S, Koynova R, Tancheva L, Tenchov B. A novel DSC approach for evaluating protectant drugs efficacy against dementia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2017;1863(11):2934-41.
141. de Britto RM, da Silva-Neto JA, Mesquita TRR, de Vasconcelos CML, de Almeida GKM, de Jesus ICG, et al. Myrtenol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through antioxidant and anti-apoptotic dependent mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;111:557-66.
142. Quiroga PR, Asensio CM, Nepote V. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of the science of food and agriculture*. 2015;95(3):471-9.
143. Yuan C, Shin M, Park Y, Choi B, Jang S, Lim C, et al. Linalool Alleviates A β 42-Induced Neurodegeneration via Suppressing ROS Production and Inflammation in Fly and Rat Models of Alzheimer's Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021;2021.
144. Javed H, Azimullah S, Meeran MF, Ansari SA, Ojha S. Neuroprotective effects of thymol, a dietary monoterpene against dopaminergic neurodegeneration in rotenone-induced rat model of Parkinson's disease. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(7):1538.
145. Alvi AM, Al Kury LT, Alattar A, Ullah I, Muhammad AJ, Alshaman R, et al. Carveol attenuates seizure severity and neuroinflammation in pentylenetetrazole-kindled

- epileptic rats by regulating the Nrf2 signaling pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2021;2021.
146. Dai M, Wu L, Yu K, Xu R, Wei Y, Chinnathambi A, et al. D-Carvone inhibit cerebral ischemia/reperfusion induced inflammatory response TLR4/NLRP3 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;132:110870.
 147. Hong DK, Choi BY, Kho AR, Lee SH, Jeong JH, Kang BS, et al. Carvacrol attenuates hippocampal neuronal death after global cerebral ischemia via inhibition of transient receptor potential melastatin 7. *Cells*. 2018;7(12):231.
 148. Huang S, Tan Z, Cai J, Wang Z, Tian Y. Myrtenol improves brain damage and promotes angiogenesis in rats with cerebral infarction by activating the ERK1/2 signalling pathway. *Pharmaceutical Biology*. 2021;59(1):584-93.
 149. Dragomanova S, Andonova V, Volcho K, Salakhutdinov N, Kalfin R, Tancheva L. Therapeutic Potential of Myrtenal and Its Derivatives—A Review. *Life*. 2023;13(10):2086.
 150. Nuutinen T. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *European journal of medicinal chemistry*. 2018;157:198-228.
 151. Additives EPoF, Flavourings, Younes M, Aquilina G, Castle L, Engel KH, et al. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 208 Revision 3 (FGE. 208Rev3): consideration of genotoxicity data on alicyclic aldehydes with α , β -unsaturation in ring/side-chain and precursors from chemical subgroup 2.2 of FGE. 19. *EFSA Journal*. 2019;17(1):e05569.
 152. Vegezzi D. Method for the preparation of verbenone, myrtenal and pinocarveol and their therapeutical use. Google Patents; 1980.
 153. Santos MRV, Moreira FV, Fraga BP, Souza DPd, Bonjardim LR, Quintans-Junior LJ. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2011;21:764-71.
 154. Yu L, Liu H, Ma X, Seshadri VD, Gao X. Anti-atherosclerotic Effects of Myrtenal in High-Fat Diet-Induced Atherosclerosis in Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2022;194(12):5717-33.
 155. Rathinam A, Pari L, Venkatesan M, Munusamy S. Myrtenal attenuates oxidative stress and inflammation in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2022;128(1):175-83.
 156. Akefe IO, Adegoke VA, Lamidi IY, Ameh MP, Idoga ES, Ubah SA, et al. Myrtenal mitigates streptozotocin-induced spatial memory deficit via improving oxido

- inflammatory, cholinergic and neurotransmitter functions in mice. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2022;3:100106.
157. Tancheva LP, Lazarova MI, Alexandrova AV, Dragomanova ST, Nicoletti F, Tzvetanova ER, et al. Neuroprotective mechanisms of three natural antioxidants on a rat model of parkinson's disease: A comparative study. *Antioxidants*. 2020;9(1):49.
 158. Akefe IO, Nyan ES, Adegoke VA, Lamidi IY, Ameh MP, Chidiebere U, et al. Myrtenal improves memory deficits in mice exposed to radiofrequency-electromagnetic radiation during gestational and neonatal development via enhancing oxido-inflammatory, and neurotransmitter functions. *Heliyon*. 2023;9(4).
 159. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(13):3328.
 160. Li W-x, Qian P, Guo Y-t, Gu L, Jurat J, Bai Y, et al. Myrtenal and β -caryophyllene oxide screened from *Liquidambaris Fructus* suppress NLRP3 inflammasome components in rheumatoid arthritis. *BMC complementary medicine and therapies*. 2021;21(1):1-16.
 161. Martins BX, Arruda RF, Costa GA, Jerdy H, de Souza SB, Santos JM, et al. Myrtenal-induced V-ATPase inhibition-A toxicity mechanism behind tumor cell death and suppressed migration and invasion in melanoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2019;1863(1):1-12.
 162. Lokeshkumar B, Sathishkumar V, Nandakumar N, Rengarajan T, Madankumar A, Balasubramanian MP. Anti-oxidative effect of myrtenal in prevention and treatment of colon cancer induced by 1, 2-dimethyl hydrazine (DMH) in experimental animals. *Biomolecules & Therapeutics*. 2015;23(5):471.
 163. Hari Babu L, Perumal S, Balasubramanian MP. Myrtenal, a natural monoterpene, down-regulates TNF- α expression and suppresses carcinogen-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012;369(1):183-93.
 164. Hari Babu L, Perumal S, Balasubramanian MP. Myrtenal attenuates diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats by stabilizing intrinsic antioxidants and modulating apoptotic and anti-apoptotic cascades. *Cellular oncology*. 2012;35:269-83.
 165. Lingaiah HB, Natarajan N, Thamaraiselvan R, Srinivasan P, Periyasamy BM. Myrtenal ameliorates diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis through the

- activation of tumor suppressor protein p53 and regulation of lysosomal and mitochondrial enzymes. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2013;27(4):443-54.
- 166.Farrag MA, Ezz MK, Ibrahim NK, Ahmed EK. Chemopreventive potential of myrtenal against nitrosamine-initiated, radiation-promoted rat bladder carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*. 2022;74(1):288-98.
 - 167.Rathinam A, Pari L. Myrtenal ameliorates hyperglycemia by enhancing GLUT2 through Akt in the skeletal muscle and liver of diabetic rats. *Chemico-biological interactions*. 2016;256:161-66.
 - 168.Rathinam A, Pari L, Chandramohan R, Sheikh BA. Histopathological findings of the pancreas, liver, and carbohydrate metabolizing enzymes in STZ-induced diabetic rats improved by administration of myrtenal. *Journal of physiology and biochemistry*. 2014;70:935-46.
 - 169.Ayyasamy R, Leelavinothan P. Myrtenal alleviates hyperglycaemia, hyperlipidaemia and improves pancreatic insulin level in STZ-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*. 2016;54(11):2521-27.
 - 170.Dragomanova S, Tancheva L, Georgieva M, Klisurov R. Analgesic and anti-inflammatory activity of monoterpenoid myrtenal in rodents. *Journal of IMAB—Annual Proceeding Scientific Papers*. 2019;25(1):2406-13.
 - 171.Guimarães AG, Quintans JSS, Quintans-Júnior LJ. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. *Phytotherapy research*. 2013;27(1):1-15.
 - 172.Corin K, Baaske P, Geissler S, Wienken CJ, Duhr S, Braun D, et al. Structure and function analyses of the purified GPCR human vomeronasal type 1 receptor 1. *Scientific reports*. 2011;1(1):172.
 - 173.Avgustinovich DF, Fomina MK, Suslov EV, Tolstikova TG, Volcho KP, Salakhutdinov NF. Effect of 2-aminoadamantane derivatives on behavior of mice in a modified light/dark test. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2014;158:213-18.
 - 174.Kim G, Kim E. Effects of treadmill training on limb motor function and acetylcholinesterase activity in rats with stroke. *Journal of physical therapy science*. 2013;25(10):1227-30.
 - 175.Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Current opinion in neurobiology*. 2006;16(6):710-15.
 - 176.Kaufmann D, Dogra AK, Wink M. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2011;63(10):1368-71.

177. Dragomanova S, Pavlov S, Marinova D, Hodzev Y, Petralia MC, Fagone P, et al. Neuroprotective Effects of Myrtenal in an Experimental Model of Dementia Induced in Rats. *Antioxidants*. 2022;11(2):374.
178. Concepción O, Belmar J, F. de la Torre A, M. Muñoz F, Pertino MW, Alarcón B, et al. Synthesis and cytotoxic analysis of novel myrtenyl grafted pseudo-peptides revealed potential candidates for anticancer therapy. *Molecules*. 2020;25(8):1911.
179. Ponomarev K, Pavlova A, Suslov E, Ardashov O, Korchagina D, Nefedov A, et al. Synthesis and analgesic activity of new compounds combining azaadamantane and monoterpene moieties. *Medicinal Chemistry Research*. 2015;24:4146-56.
180. Ponomarev K, Morozova E, Pavlova A, Suslov E, Korchagina D, Nefedov A, et al. Synthesis and analgesic activity of amines combining diazaadamantane and monoterpene fragments. *Medicinal Chemistry*. 2017;13(8):773-79.
181. Teplov GV, Suslov EV, Zarubaev VV, Shtro AA, Karpinskaya LA, Rogachev AD, et al. Synthesis of new compounds combining adamantanamine and monoterpene fragments and their antiviral activity against influenza virus A (H1N1) pdm09. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2013;10(6):477-85.
182. Kapitsa IG, Suslov EV, Teplov GV, Korchagina DV, Komarova NI, Volcho KP, et al. Synthesis and anxiolytic activity of 2-aminoadamantane derivatives containing monoterpene fragments. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;46:263-65.
183. Dragomanova S, Andonova V, Lazarova M, Munkuev A, Suslov E, Volcho K, et al. Memory-improving effects of myrtenal-adamantane conjugates. *Journal of Chemical Technology & Metallurgy*. 2023;58(3).
184. Drugbank. <https://go.drugbank.com/drugs/DB15785> Son Erişim Tarihi 7 Nisan 2024
185. McCord JM. Superoxide dismutase, lipid peroxidation, and bell-shaped dose response curves. *Dose-Response*, 2008;6.3-012.
186. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal Of Biological Chemistry*. 1969;244(22):6049-55.
187. Hipskind PA, Lobb KL, Nixon JA, Britton TC, Bruns RF, Catlow J, et al. Potent and selective 1, 2, 3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997;40(23):3712-14.
188. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*. 1988;34(3):497-500.

189. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *The Journal Of Laboratory And Clinical Medicine*. 1963;61:882-88.
190. Esterbauer H, Cheeseman KH. [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods In Enzymology*. 186: Elsevier; 1990. p. 407-21.
191. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *Journal Of Renal Injury Prevention*. 2015;4(2):20.
192. Cowled P, Fitridge R. Mechanisms of vascular disease: Pathophysiology Of Reperfusion Injury. 2011.
193. Rodriguez JD, Hithe CC. Perioperative Acute Kidney Injury. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022.
194. Tomsa AM, Alexa AL, Junie ML, Rachisan AL, Ciurmarnean L. Oxidative stress as a potential target in acute kidney injury. *PeerJ*. 2019;7:e8046.
195. Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*. 2019;2019.
196. Chen W, Li D. Reactive oxygen species (ROS)-responsive nanomedicine for solving ischemia-reperfusion injury. *Frontiers in Chemistry*. 2020:732.
197. Dubey N, Khan AM, Raina R. Sub-acute deltamethrin and fluoride toxicity induced hepatic oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*. 2013;91(3):334-8.
198. Grekas D, Dioudis C, Papageorgiou G, Iliadis S, Zilidis C, Alivanis P, et al. Lipid peroxidation after acute renal ischemia and reperfusion in rats: the effect of trimetazidine. *Renal Failure*. 1996;18(4):545-52.
199. Li W-H, Yang Y-L, Cheng X, Liu M, Zhang S-S, Wang Y-H, et al. Baicalein attenuates caspase-independent cells death via inhibiting PARP-1 activation and AIF nuclear translocation in cerebral ischemia/reperfusion rats. *Apoptosis : An International Journal On Programmed Cell Death*. 2020;25(5):354-69.
200. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*. 1999;31(4):273-300.
201. Lien YH, Lai LW, Silva AL. Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice. *Life Sciences*. 2003;74(5):543-52.

202. Dishart MK, Kellum JA. An evaluation of pharmacological strategies for the prevention and treatment of acute renal failure. *Drugs*. 2000;59(1):79-91.
203. Chatterjee PK, di Villa Bianca RD, Sivarajah A, McDonald MC, Cuzzocrea S, Thiernemann C. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces renal dysfunction and injury caused by ischemia/reperfusion of the rat kidney. *Eur J Pharmacol*. 2003;482(1-3):271-80.
204. Mohamed ME, Elmorsy MA, Younis NS. Renal Ischemia/Reperfusion Mitigation via Geraniol: The Role of Nrf-2/HO-1/NQO-1 and TLR2, 4/MYD88/NFκB Pathway. *Antioxidants*. 2022;11(8):1568.
205. Babaeenezhad E, Hadipour Moradi F, Rahimi Monfared S, Fattahi MD, Nasri M, Amini A, et al. D-Limonene alleviates acute kidney injury following gentamicin administration in rats: role of NF-κB pathway, mitochondrial apoptosis, oxidative stress, and PCNA. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*. 2021;2021:1-16.
206. Hari Babu L, Perumal S, Balasubramanian MP. Myrtenal attenuates diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats by stabilizing intrinsic antioxidants and modulating apoptotic and anti-apoptotic cascades. *Cellular Oncology*. 2012;35(4):269-83.
207. Rathinam A, Pari L, Chandramohan R, Sheikh BA. Histopathological findings of the pancreas, liver, and carbohydrate metabolizing enzymes in STZ-induced diabetic rats improved by administration of myrtenal. *Journal Of Physiology And Biochemistry*. 2014;70(4):935-46.
208. Wojtunik-Kulesza KA, Kasprzak K, Oniszczyk T, Oniszczyk A. Natural monoterpenes: Much more than only a scent. *Chemistry & Biodiversity*. 2019;16(12):e1900434.
209. Wojtunik KA, Ciesla LM, Waksmundzka-Hajnos M. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 2014;62(37):9088-94.
210. Boopathy LK, Roy A, Gopal T, Kandy RRR, Arumugam MK. Potential molecular mechanisms of myrtenal against colon cancer: A systematic review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2024;38(1):e23525.
211. Park K, Steffes M, Lee DH, Himes JH, Jacobs DR, Jr. Association of inflammation with worsening HOMA-insulin resistance. *Diabetologia*. 2009;52(11):2337-44.

212. Shahid M, Francis J, Majid DSA. Tumor necrosis factor- α induces renal vasoconstriction as well as natriuresis in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2008;295(6):F1836-F44.
213. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology*. 2012;2(2):1303.
214. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Of Inflammation*. 2009;2009.
215. Yang K, Li W-F, Yu J-F, Yi C, Huang W-F. Diosmetin protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in mice. *journal of surgical research*. 2017;214:69-78.
216. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*. 2017;2017.
217. Ortadeveci A, Semih Ö. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Bir Derleme. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2017;39(3):115-24.
218. Abhirami N, Chandran M, Ramadasan A, Bhasura D, Plakkal Ayyappan J. Myrtenal exhibits cardioprotective effects by attenuating the pathological progression associated with myocardial infarction. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2023.
219. Peng F, Liao M, Qin R, Zhu S, Peng C, Fu L, et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):286.
220. Singh V, Khurana A, Navik U, Allawadhi P, Bharani KK, Weiskirchen R. Apoptosis and pharmacological therapies for targeting thereof for cancer therapeutics. *Sci*. 2022;4(2):15.
221. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(8):2199-210.
222. Amirteimoury M. Myrtenol protects against acute kidney injury induced by cisplatin in mice. *Research Journal of Pharmacognosy*. 2023;10(3):5-13.
223. Tan J. Preventive Effect of Alpha-pinene on Cisplatin-induced Kidney Injury by Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis via NF- κ B Signaling Pathway. *Letters in Drug Design & Discovery*. 2023;20:1-7.
224. Yang S, Chou W-P, Pei L. Effects of propofol on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013;6(5):1177-83.

- 225.Rahman M, Shad F, Smith MC. Acute kidney injury: a guide to diagnosis and management. *American Family Physician*. 2012;86(7):631-39.
- 226.Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(10):2534-43.
- 227.Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, Steven Potter S. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2003;80(4):365-76.
- 228.Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(7):4135-42.
- 229.Luo Q-H, Chen M-L, Chen Z-L, Huang C, Cheng A-C, Fang J, et al. Evaluation of KIM-1 and NGAL as early indicators for assessment of gentamycin-induced nephrotoxicity in vivo and in vitro. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2016;41(6):911-18.

EKLER

EK- 1. Özgeçmiş



EK 2. ETİK KURUL KARARI

