

**T.C.**  
**ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**NARİNGİNİN KURŞUN ASETAT İLE İNDÜKLENMİŞ**  
**NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE OLAN ETKİSİNDE PI3K/AKT**  
**YOLAĞININ ROLÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MURAT KIRAÇ**

**DANIŞMAN**  
**PROF. DR. DENİZ TAŞTEMİR KORKMAZ**  
**2. DANIŞMAN**  
**DR. ÖĞRETİM ÜYESİ SEBİLE AZIRAK**

**ADİYAMAN, 2025**

T.C.  
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

NARİNGİNİN KURŞUN ASETAT İLE İNDÜKLENMİŞ  
NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE OLAN ETKİSİNDE PI3K/AKT  
YOLAĞININ ROLÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MURAT KIRAÇ

DANIŞMAN  
PROF. DR. DENİZ TAŞTEMİR KORKMAZ  
2. DANIŞMAN  
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ SEBİLE AZIRAK

ADYAMAN, 2025

*Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen TIPFYL/2024-0002 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

## ÖZET

### NARINGİNİN KURŞUN ASETAT İLE İNDÜKLENMİŞ NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE OLAN ETKİSİNDE PI3K/AKT YOLAĞININ ROLÜ

**Murat KIRAC**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**Adıyaman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Eylül/2025, Sayfa: 66**

**Danışman: Prof. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ**

**2. Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Sebile AZIRAK**

Kurşun (Pb), çevrede yaygın bulunan ve endüstriyel alanlarda yoğun kullanılan toksik bir ağır metaldir. Kemik ve dişlerde depolanarak kronik maruziyette başta sinir sistemi ve böbrekler olmak üzere çoklu organ disfonksiyonuna yol açar. Naringin (N) ise özellikle turunçgillerde bulunan, antioksidan özelliklere sahip bir flavonoiddir. Bu çalışmanın amacı, Pb kaynaklı böbrek hasarında N'nin koruyucu etkisini ve bu etkinin PI3K/Akt sinyal yolağı ile ilişkisini; gen ekspresyon düzeyleri, antioksidan savunma sistemi, biyokimyasal göstergeler, element düzeyleri ve histopatolojik bulgular üzerinden değerlendirmektir. Çalışmada Wistar sıçanlar kontrol, N, kurşun asetat (PbAc) ve PbAc + N gruplarına ayrıldı. Böbrek dokuları element analizi, enzimatik ve non-enzimatik aktivite ölçümleri, PI3K ve Akt1 gen ekspresyonu, histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için; kan örnekleri ise biyokimyasal parametreler için intrakardiyak olarak alındı. PbAc grubunda kreatinin, üre, Mn, Pb, Mg, AChE, GST, MDA düzeyleri ve PI3K/Akt1 ekspresyonu artarken; Cu, Fe, Zn, Ca, CaE ve GR aktiviteleri ile GSH düzeyi kontrol grubuna kıyasla azaldı. PbAc + N grubunda ise bu değişikliklerin belirgin biçimde tersine döndüğü ve PbAc'ye bağlı böbrek yapısal hasarında iyileşme olduğu saptandı. Ayrıca böbrek dokusunda PI3K ve Akt1 immünoreaktivitesi PbAc grubunda diğer gruplara kıyasla yüksek olarak bulundu. Bulgular, PbAc'nin ROS aracılı PI3K/Akt aktivasyonu üzerinden oksidatif stres, esansiyel element dengesizliği ve histopatolojik hasar oluşturduğunu; N'nin bu süreçleri baskılayarak nefrotoksisiteyi anlamlı ölçüde azalttığını göstermektedir. N, PbAc kaynaklı böbrek hasarına karşı umut verici bir terapötik aday olup, klinik doğrulama için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Kurşun asetat; Naringin; Nefrotoksisite; PI3K/AKT yolağı

## ABSTRACT

### THE ROLE OF PI3K/AKT PATHWAY IN THE EFFECT OF NARINGIN ON LEAD ACETATE-INDUCED NEPHROTOXICITY

**Murat KIRAC**

**Department of Medical Biology**

**Adiyaman University, Graduate Education Institute, September/2025, Page: 66**

**Supervisor: Prof. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ**

**2<sup>nd</sup> Supervisor: Astd. Prof. Dr. Sebile AZIRAK**

Lead (Pb) is a toxic heavy metal that is widespread in the environment and extensively used in industrial settings. By accumulating in bones and teeth, chronic exposure leads to multi-organ dysfunction, primarily affecting the nervous system and kidneys. Naringin (N) is a flavonoid predominantly found in citrus fruits with well-known antioxidant properties. This study aimed to evaluate the protective effect of N against Pb-induced kidney injury and its relationship with the PI3K/Akt signaling pathway, based on gene expression levels, antioxidant defense systems, biochemical indicators, element levels, and histopathological findings. Wistar rats were assigned to control, N, lead acetate (PbAc), and PbAc + N groups. Kidney tissues were collected for elemental analysis, enzymatic and non-enzymatic activity assays, PI3K and Akt1 gene expression, histopathological and immunohistochemical examinations, while blood samples were obtained intracardially for biochemical parameters. In the PbAc group, creatinine, urea, Mn, Pb, and Mg levels, as well as AChE and GST activities, MDA levels, and PI3K/Akt1 expression increased, whereas Cu, Fe, Zn, and Ca levels, CaE and GR activities, and GSH levels decreased compared with the control group. In the PbAc + N group, these alterations were markedly reversed, and structural kidney damage attributable to PbAc showed improvement. Additionally, PI3K and Akt1 immunoreactivity in kidney tissue was higher in the PbAc group than in the other groups. These findings indicate that PbAc induces oxidative stress, essential element imbalance, and histopathological damage via ROS-mediated activation of PI3K/Akt, while N mitigates these processes and significantly attenuates nephrotoxicity. N appears to be a promising therapeutic candidate against PbAc-induced kidney injury; however, further clinical studies are warranted for validation.

**Keywords:** Lead acetate; Naringin; Nephrotoxicity; PI3K/AKT pathway

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgi, birikim ve tecrübeleriyle her daim yanımda olan; desteğini daima hissettiren, eğitimi ve bilimi daha çok sevmemi sağlayan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmalarda, laboratuvar analizlerinde ve tez süresince ikinci tez danışmanlığımı üstlenen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sebile AZIRAK'a da teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA'ya ve Dr. Öğretim Üyesi Ahmet TÜRK'e, yüksek lisans eğitimim boyunca verdikleri derslerle tıbbi biyoloji alanındaki bilgi ve yetkinliğime değerli katkılar sunan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Önder YUMRUTAŞ, Doç. Dr. Yusuf ÖZAY ve Doç. Dr. İbrahim BOZGEYİK'e teşekkürlerimi arz ederim. Eğitim sürecim boyunca desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşım Ayşegül ACET'e de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her koşulda yanımda olarak sevgileri ve karşılıksız destekleriyle bana güç veren, varlıklarıyla hayatıma anlam katan ve daima motivasyon kaynağım olan kıymetli aileme en derin şükranlarımı sunarım.

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Adıyaman Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Murat KIRAC

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

|                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| BAŞLIK SAYFASI .....                                                   | i   |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....                                             | ii  |
| ÖZET .....                                                             | iii |
| ABSTRACT.....                                                          | iv  |
| TEŞEKKÜR .....                                                         | v   |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....                      | vi  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                      | vii |
| TABLolar DİZİNİ.....                                                   | ix  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                  | x   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                   | xii |
| 1. GİRİŞ.....                                                          | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                | 4   |
| 2.1. Kurşun.....                                                       | 4   |
| 2.2. Böbrekler.....                                                    | 6   |
| 2.2.1. Kurşunun böbrekler üzerine etkisi .....                         | 8   |
| 2.3. Oksidatif Stres.....                                              | 8   |
| 2.3.1. Oksidatif strese bağlı kanser oluşumu .....                     | 10  |
| 2.3.2. Kardiyovasküler hastalıklar ve oksidatif stres .....            | 10  |
| 2.3.3. Nörolojik hastalıklar ve oksidatif stres .....                  | 11  |
| 2.3.4. Solunum sistemi hastalıkları ve oksidatif stres.....            | 11  |
| 2.3.5. Romatoid artrit ve oksidatif stres .....                        | 11  |
| 2.3.6. Cinsel olgunlaşma ve oksidatif stres .....                      | 11  |
| 2.3.7. Böbrek hastalıkları ve oksidatif stres.....                     | 12  |
| 2.4. Antioksidanlar.....                                               | 13  |
| 2.5. Flavonoidler .....                                                | 13  |
| 2.5.1. Naringin .....                                                  | 14  |
| 2.6. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) /Akt Yolağı.....                | 16  |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                             | 19  |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları ve Yapılan Uygulamalar..... | 19  |
| 3.2. Biyokimyasal Analizler .....                                      | 21  |
| 3.3. Element Analizi .....                                             | 21  |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.1. Element analizinde kullanılan ekipmanlar ve reaktifler .....  | 21 |
| 3.3.2. Böbrek dokularının çözünürleştirilmesi .....                  | 21 |
| 3.4. Toplam Protein, Enzim ve Non-Enzimatik Aktivite Analizleri..... | 22 |
| 3.4.1. Toplam protein tayini.....                                    | 23 |
| 3.4.2. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi .....                      | 23 |
| 3.4.2.1. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi .....                  | 23 |
| 3.4.2.2. Karboksilesteraz (CaE) aktivitesi.....                      | 24 |
| 3.4.2.3. Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi .....               | 24 |
| 3.4.2.4. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi.....                     | 24 |
| 3.4.3. Non-enzimatik aktivitelerin belirlenmesi.....                 | 25 |
| 3.4.3.1. Malondialdehit (MDA) miktarının tayini .....                | 25 |
| 3.4.3.2. Redükte glutasyon (GSH) miktarının tayini .....             | 25 |
| 3.5. Gen Ekspresyonu Analizi.....                                    | 25 |
| 3.5.1. Ribo Nükleik Asit (RNA) izolasyonu .....                      | 25 |
| 3.5.2. Complementary (cDNA) eldesi.....                              | 26 |
| 3.5.3. Real-Time PCR.....                                            | 27 |
| 3.6. Histolojik Analizler .....                                      | 29 |
| 3.6.1. Histopatolojik analizler .....                                | 29 |
| 3.6.2. İmmünohistokimyasal analizler .....                           | 30 |
| 3.7. İstatistiksel Analiz .....                                      | 30 |
| 4. BULGULAR.....                                                     | 32 |
| 4.1. Biyokimyasal Analiz Bulguları .....                             | 32 |
| 4.2. Element Analiz Bulguları.....                                   | 32 |
| 4.3. Enzimatik ve Non-Enzimatik Aktivite Bulguları.....              | 33 |
| 4.4. Gen Ekspresyonu Bulguları.....                                  | 36 |
| 4.5. Histolojik Analiz Sonuçları.....                                | 37 |
| 4.5.1. Histopatolojik bulgular .....                                 | 37 |
| 4.5.2. İmmünohistokimyasal bulgular .....                            | 42 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                    | 46 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....                                           | 53 |
| KAYNAKÇA .....                                                       | 54 |
| EKLER                                                                |    |
| ÖZ GEÇMİŞ                                                            |    |

## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                               | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Tablo 3.1.</b> Deney grupları ve yapılan uygulamalar .....                                 | 19    |
| <b>Tablo 3.2.</b> HR CS-FAAS cihazına ait ölçüm değişkenleri .....                            | 22    |
| <b>Tablo 3.3.</b> Metallerin kalibrasyon denklemleri ile korelasyon katsayıları.....          | 22    |
| <b>Tablo 3.4.</b> cDNA eldesi için hazırlanan reaksiyon.....                                  | 26    |
| <b>Tablo 3.5.</b> cDNA sentezi termal döngü koşulları .....                                   | 27    |
| <b>Tablo 3.6.</b> RT-PCR reaksiyon bileşenleri .....                                          | 27    |
| <b>Tablo 3.7.</b> RT-PCR’da uygulanan sıcaklık koşulları.....                                 | 28    |
| <b>Tablo 3.8.</b> Primer dizileri .....                                                       | 28    |
| <b>Tablo 3.9.</b> Doku takip serileri.....                                                    | 29    |
| <b>Tablo 4.1.</b> Çalışma grubuna ait kreatinin ve üre düzeyleri .....                        | 32    |
| <b>Tablo 4.2.</b> Çalışma grubuna ait PI3K ve Akt gen ekspresyon düzeyleri .....              | 36    |
| <b>Tablo 4.3.</b> Sıçan böbrek dokularının semikantitatif histopatolojik skorlama sonuçları . | 41    |
| <b>Tablo 4.4.</b> Böbrek dokusunda Akt-1 immünoreaktivitesine ait histoskorlama.....          | 43    |
| <b>Tablo 4.5.</b> Böbrek dokusunda PI3K immünoreaktivitesine ait histoskorlama.....           | 45    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Pb'ye maruz kalan hücrelerde OS'nin gelişmesinin altında yatan mekanizma                                                                                                                  | 5  |
| Şekil 2.2. İnsan böbrek yapısı.....                                                                                                                                                                  | 7  |
| Şekil 2.3. Antioksidan-serbest radikal dengesi ve oksidatif hasar.....                                                                                                                               | 9  |
| Şekil 2.4. Flavonoidlerin sınıflandırılması. (A) Flavonlar, (B) Flavonoller, (C) Flavanonlar, (D) İzoflavonoidler, (E) Neoflavonoidler, (F) Flavanoller (flavan-3-oller) ve (G) Antosiyaninler ..... | 14 |
| Şekil 2.5. Naringinin kimyasal yapısı .....                                                                                                                                                          | 15 |
| Şekil 2.6. PI3K/Akt yolağı .....                                                                                                                                                                     | 18 |
| Şekil 3.1. Sıçanlardan intrakardiyak yolla kan numunelerin alınması.....                                                                                                                             | 20 |
| Şekil 3.2. Sıçanlardan böbrek doku örneklerinin alınması.....                                                                                                                                        | 20 |
| Şekil 4.1. PbAc ve N'nin böbrek fonksiyonu üzerine olan etkisi.....                                                                                                                                  | 32 |
| Şekil 4.2. Böbrek dokusuna ait metal düzeyleri .....                                                                                                                                                 | 34 |
| Şekil 4.3. Böbrek dokusundaki enzim aktivite .....                                                                                                                                                   | 35 |
| Şekil 4.4. Böbrek MDA ve GSH seviyeleri (A) MDA seviyesi (B) GSH seviyesi.....                                                                                                                       | 35 |
| Şekil 4.5. Çalışma grubuna ait PI3K ve Akt1 gen ekspresyon seviyeleri.....                                                                                                                           | 36 |
| Şekil 4.6. H & E ile boyanan K (A) ve N gruplarına (B) ait böbrek dokularının histolojik görüntüsü.....                                                                                              | 37 |
| Şekil 4.7. Masson Trikom ile boyanan K (A) ve N gruplarına (B) ait böbrek dokularının histolojik görüntüsü .....                                                                                     | 38 |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.8.</b> H & E ile boyanan PbAc grubuna ait sıçan böbrek dokularının histolojik görüntüsü .....             | 39 |
| <b>Şekil 4.9.</b> Masson Trikom ile boyanan PbAc grubuna ait sıçan böbrek dokularının histolojik görüntüsü.....      | 40 |
| <b>Şekil 4.10.</b> H & E ile boyanan PbAc + N grubuna ait sıçan böbrek dokularının histolojik görüntüsü .....        | 42 |
| <b>Şekil 4.11.</b> Masson Trikom ile boyanan PbAc + N grubuna ait sıçan böbrek dokularının histolojik görüntüsü..... | 42 |
| <b>Şekil 4.12.</b> Böbrek dokusundaki Akt-1 immünreaktivitesi .....                                                  | 43 |
| <b>Şekil 4.13.</b> Böbrek dokusundaki PI3K immünreaktivitesi .....                                                   | 44 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                  |                                       |
|------------------|---------------------------------------|
| A $\beta$        | : $\beta$ -amiloid                    |
| AChE             | : Asetilkolinesteraz                  |
| ACTI             | : Asetiltiyokolin iodid               |
| AD               | : Alzheimer Hastalığı                 |
| AEC              | : 3-Amino-9-Ethylcarbazole            |
| Akt              | : Protein Kinaz B                     |
| Al               | : Alüminyum                           |
| As               | : Arsenik                             |
| ATP              | : Adenozin Trifosfat                  |
| BCR              | : B Hücre Reseptör Adaptörleri        |
| BUN              | : Üre                                 |
| Ca               | : Kalsiyum                            |
| CaE              | : Karboksilesteraz                    |
| CAT              | : Katalaz                             |
| CCl <sub>4</sub> | : Karbon Tetraklorür                  |
| Cd               | : Kadmiyum                            |
| cDNA             | : Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA) |
| CDNB             | : 1-kloro-2,4-dinitrobenzen           |
| cm               | : Santimetre                          |
| Co               | : Kobalt                              |

|       |                                       |
|-------|---------------------------------------|
| Cr    | : Krom                                |
| CREA  | : Kreatinin                           |
| Cu    | : Bakır                               |
| ddH2O | : Çift Damıtılmış Su                  |
| dk    | : Dakika                              |
| DNA   | : Deoksiribo Nükleik Asit             |
| DTNB  | : 5,5-Dithio-Bis-2-Nitrobenzoic Asit  |
| EDTA  | : Etilendiamintetraasetik Asit        |
| eGFR  | : Glomerüler Filtrasyon Hızı          |
| EGFR  | : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü  |
| Fe    | : Demir                               |
| FOXO  | : Forkhead box O                      |
| g     | : Gram                                |
| GAPDH | : Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz |
| GPCR  | : G-protein Bağlantılı Reseptörler    |
| GPx   | : Glutasyon Peroksidaz                |
| GR    | : Glutasyon Redüktaz                  |
| GSH   | : Glutasyon                           |
| GSK3  | : Glycogen Synthase Kinase 3          |
| GSSG  | : Oksitlenmiş Glutasyon               |
| GST   | : Glutasyon S-Transferaz              |

|                               |                                            |
|-------------------------------|--------------------------------------------|
| h                             | : Saat                                     |
| HClO <sub>4</sub>             | : Perklorik Asit                           |
| HCO <sub>3</sub>              | : Nitrik Asit                              |
| Hg                            | : Civa                                     |
| HHG                           | : Hipotalamus-Hipofiz-Gonad                |
| HNE                           | : 4-Hidroksinonenal                        |
| H <sub>2</sub> O              | : Su                                       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrojen Peroksit                        |
| HO                            | : Hidroksil Radikali                       |
| HR CS FAAS                    | : Alevli Atomik Absorpsiyon Spektrometresi |
| IGF-1                         | : İnsülin benzeri büyüme faktörü 1         |
| IL-1 $\beta$                  | : İnterlökin 1 Beta                        |
| K                             | : Kontrol                                  |
| Kg                            | : Kilogram                                 |
| KOAH                          | : Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı      |
| L                             | : Litre                                    |
| LDL                           | : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein             |
| M                             | : Molar                                    |
| MAPK                          | : Mitogenle Aktive Edilen Protein Kinaz    |
| MDA                           | : Malondialdehit                           |
| mg                            | : Miligram                                 |

|                              |                                         |
|------------------------------|-----------------------------------------|
| Mg                           | : Magnezyum                             |
| mL                           | : Mililitre                             |
| mm                           | : Milimetre                             |
| mM                           | : Milimolar                             |
| Mn                           | : Mangan                                |
| mTOR                         | : Rapamisin Memeli Hedefi               |
| mTORC                        | : Mammalian Target of Rapamycin Complex |
| MΩ                           | : Mikro Ohm                             |
| n                            | : Örnek sayısı                          |
| N                            | : Naringin                              |
| NADPH                        | : Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat |
| NF-κB                        | : Nuklear Faktor kappa B                |
| Ni                           | : Nikel                                 |
| nm                           | : Nanometre                             |
| NO                           | : Nitrik Oksit                          |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> | : Süperoksit Radikali                   |
| OS                           | : Oksidatif Stress                      |
| oxLDL                        | : Okside Düşük Yoğunluklu Lipoprotein   |
| P                            | : Fosfor                                |
| Pb                           | : Kurşun                                |
| PbAc                         | : Kurşun Asetat                         |

|        |                                                       |
|--------|-------------------------------------------------------|
| PBS    | : Phosphate Buffered Saline                           |
| PDK1   | : 3-Fosfoinozid Bağımlı Kinaz-1                       |
| pH     | : Power of Hydrogene                                  |
| PI3K   | : Fosfatidilinositol 3-Kinaz                          |
| pm     | : Pikometre                                           |
| PNPA   | : p-nitrofenil asetat                                 |
| ppm    | : Toplam Madde Miktarının Milyonda 1 Birimlik Maddesi |
| Rpm    | : Dakika Başına Devir                                 |
| PTEN   | : Phosphatase and Tensin Homolog                      |
| PTFE   | : Politetrafloretillen                                |
| RNA    | : Ribo Nükleik Asit                                   |
| RNS    | : Reaktif Azot Türleri                                |
| ROS    | : Reaktif Oksijen Türleri                             |
| RPE    | : RNA Purification Elution                            |
| RTK    | : Reseptör Tirozin Kinaz                              |
| RT-PCR | : Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu          |
| Se     | : Selenyum                                            |
| sn     | : Saniye                                              |
| SOD    | : Süperoksit Dismutaz                                 |
| SPSS   | : Statistical Package for the Social Sciences         |
| SS     | : Standart Sapma                                      |

|                    |                                   |
|--------------------|-----------------------------------|
| TBA                | : Tiyobarbitürik Asit             |
| TCR                | : T Hücre Reseptörü               |
| TGF- $\beta$       | : Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta |
| Ti                 | : Titanyum                        |
| Tl                 | : Talyum                          |
| TNF- $\alpha$      | : Tümör Nekroz Faktörü Alfa       |
| Trx                | : Tiyoredoksin                    |
| v                  | : Hacim                           |
| Zn                 | : Çinko                           |
| $^1\text{O}_2$     | : Singlet Oksijen                 |
| $^{\circ}\text{C}$ | : Santrigrat                      |
| %                  | : Yüzde                           |
| $\mu$              | : Mikron                          |
| $\epsilon$         | : Molar Absorptivite Katsayısı    |

## 1. GİRİŞ

Endüstrinin gelişmesi ile birlikte toprak, hava ve su ağır metaller olmak üzere birçok tehlikeli maddelerle kirlenmekte ve bu alanlarda yaşayan bireylerde başta kanser olmak üzere birçok olumsuz sağlık sorunları görülmektedir (Ooka vd., 2025). Toksik etki içeren ağır metaller ve maddelere örnek olarak; kurşun (Pb), alüminyum (Al), arsenik (As), kadmiyum (Cd), krom (Cr), kobalt (Co), bakır (Cu), demir (Fe), civa (Hg), nikel (Ni), talyum (Tl), titanyum (Ti), çinko (Zn), karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>), ftalatlar, glifosat vb. verilebilir (Teschke & Xuan, 2022). Ağır metallerin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri bilinmekle birlikte, hücresel düzeyde ağır metal kaynaklı toksisitenin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Wang vd., 2025). Bildiğimiz kadarıyla ağır metal kaynaklı toksinlere maruz kalmak hücresel homeostaziye bozarak oksidatif stres (OS)'e neden olur ve hasarlı protein ile organellerin parçalanmasını sağlayan otofajilizozomal yolağı başta olmak üzere kritik hücresel süreçlerin işlevini engelleyerek zararlı maddelerin hücrede birikmesine, inflamasyona ve sonuçta artan hücresel hasara yol açabilir (Das vd., 2025). Ağır metallerin toksisite derecesi söz konusu metalin özelliklerine, dozuna, maruz kalma yoluna, maruz kalma süresine (akut veya kronik) ve biyoakümüülasyonunun kapsamına bağlıdır (Jomova vd., 2025). Ağır bir metal olan Pb, insanlarda ve hayvanlarda birçok dokuda toksikolojik etkilere sahip en yaygın ağır metallerden biridir (Haj-Khlifa vd., 2025). Günümüzde Pb, piller, madencilik, dökümhaneler, elektronik atık geri dönüşümü, eritme ve boyama dahil birçok alanda olmak üzere çeşitli antropojenik kaynaklardan yayılmaya devam etmektedir (Gonzalez-Villalva vd., 2025). Pb'nin insan sağlığı için belirlenmiş güvenli bir konsantrasyonu olmadığından çevresel bir endişe kaynağı olmaya devam etmekte ve özellikle Pb'ye mesleki maruziyet, Pb endüstrilerinin yakınında yaşayan işçiler ve bireyler için önemli bir risk oluşturmaktadır (Gonzalez-Villalva vd., 2025).

İnsan vücudundaki neredeyse her organı ve dokuyu etkileyen Pb, çok yönlü bir ağır metal olup parçalanamaz ve vücutta teşhis edilmeden birikme yeteneği, Pb'yi ciddi bir çevre sağlığı tehlikesi haline getirmektedir (Sachdeva vd., 2018). Pb toksisitesi öncelikle beyni, üreme sistemini, böbrekleri ve kardiyovasküler sistemleri etkilemektedir (Ali vd., 2025). Pb kontaminasyonu özellikle kronik böbrek hastalığında potansiyel bir risk faktörü olarak tespit edilmiştir (Huang vd., 2018). Dünya genelinde kronik böbrek hastalığı, toplam nüfusun % 10'undan fazlasını veya 800 milyondan fazla insanı etkilemekle

birlikte özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde ekonomik açıdan ağır bir yük oluşturmaktadır (Gembillo vd., 2023). Böbrekler, iki değerlikli iyonların, metabolik artıkların, çözünebilen maddelerin ve ksenobiyotiklerin eliminasyonunda görev alan filtrasyon, geri emilim ve konsantrasyon süreçlerinde yüksek enerji ihtiyacına sahiptir. Bu nedenle böbrek hücreleri mitokondri açısından zengin bir yapıya sahiptir. Ancak ağır metaller, enerji üretiminde kritik rol üstlenen mitokondrilere karşı yüksek toksisite göstermekte ve bu durum böbrekleri ağır metal maruziyetinde primer hedef organ konumuna getirmektedir (Lentini vd., 2017; Turkington vd., 2025).

Pb, solunum, yutma ve dermal temas gibi çeşitli kaynaklar ve yollarla insan vücuduna girer ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu ile sağlık üzerine olumsuz etkilere yol açabilir (Neha vd., 2025). Fe, Cu ve Cr gibi redoks-aktif metaller redoks döngüsüne girerken, Pb, Cd, Hg ve diğerleri gibi redoks-inaktif metaller ise hücrelerin başlıca antioksidanlarını, özellikle tiyol içeren antioksidanları ve enzimleri tüketerek hidroksil radikali (HO), süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) veya hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi ROS üretiminde artışa neden olur (Ercal vd., 2001). Hücrel ROS, canlı hücrelerde aerobik metabolizmanın bir yan ürünü olarak üretilir ve fizyolojik konsantrasyonları sinyal iletimi ve homeostaz için önemlidir (Chaturvedi vd., 2025). Ancak aşırı ROS üretimi, hücrel antioksidan kapasitesini aşarak lipidler, karbonhidratlar, proteinler ve deoksiribonükleik asit (DNA) dahil olmak üzere makromoleküllerde oksidatif hasara neden olur (Aryal vd., 2025). Çeşitli hastalıklar üzerine yapılan araştırmalardan elde edilen kanıtlar, OS'nin kanser, yaşlanma, diyabet, nörodejeneratif bozukluklar, obezite, inflamasyon, apoptoz, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve kalp yetmezliğinin patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermektedir (Pitocco vd., 2010). Hücreler aşırı ROS'u nötralize etmek için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazlar (GPxs), tiyoredoksin (Trx) gibi enzimatik antioksidanların yanı sıra oksidatif durumu topluca azaltan enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan dengeli bir sistem geliştirmişlerdir (He vd., 2017).

Yapılan bir çalışmada Pb kontaminasyonu sonucu oluşan ciddi sağlık risklerine karşı etkili iyileştirme ve koruma stratejilerinin uygulanması gerektiği vurgulanmıştır (Lee vd., 2025). Son araştırmalar Pb toksisitesinin hafifletilmesinde alternatif tedavilerin başında; doğal olarak oluşan biyoaktif bileşiklerin, bitki kaynaklı özütlerin ve nanoteknoloji tabanlı stratejilerin potansiyelini giderek daha fazla gözler önüne

sermektedir (Bharti & Gopalakrishnan, 2025). Doğal ürünler, böbrek hasarında rol oynayan önemli proteinleri düzenlemedeki çok hedefli ve sinerjik etkileri nedeniyle değerli nefroprotektif ajanlar olarak öne sürülmüştür (Castañeda vd., 2023). Doğal bir ürün olan Naringin (N), bir flavanon glikozidi olup turunçgillerde, sebzelerde ve alkollü içeceklerde yaygın olarak bulunur (Babu vd., 2025). Yapılan çalışmalarda N'nin önemli antioksidan ve anti-neovasküler (Yang vd., 2025), antikanser (Alhalmi vd., 2025) ve anti-inflamatuvar (Lyu vd., 2025) özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Yaşlanmaya, kansere ve diğer hastalıklara yol açan aşırı ROS'u temizlemek için etkili antioksidanlar aramak modern tıbbın odak noktası haline gelmiştir (Hu vd., 2022). Dolayısıyla bu çalışmada kurşun asetatın (PbAc) OS, esansiyel elementler, apoptotik süreçte rol oynayan moleküler yollar ve böbrek histopatolojisine odaklanarak, N'nin PbAc kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkilerini araştırdık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kurşun

Pb, Latince “plumbum” olarak adlandırılan, periyodik tablonun karbon grubunda (Grup 14) yer alan ve atom numarası 82 olan ağır bir metaldir (Tahir ve Alkheraije, 2023). Doğal olarak toz, toprak ve su gibi çevresel matrislerde bulunabilen Pb (Debnath vd., 2019), belirgin nefrotoksik etkileriyle bilinen toksik bir elementtir (Barregard vd., 2022). Dünya genelinde en yaygın kullanılan metaller arasında yer almakta olup, 900’ü aşkın endüstride çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Karrari vd., 2012). Kimyasal açıdan hem asitlerle hem de bazlarla reaksiyona girebilmesi ve farklı metallerle bileşikler ya da alaşımlar oluşturabilmesi, endüstriyel uygulama alanlarını genişletmektedir.

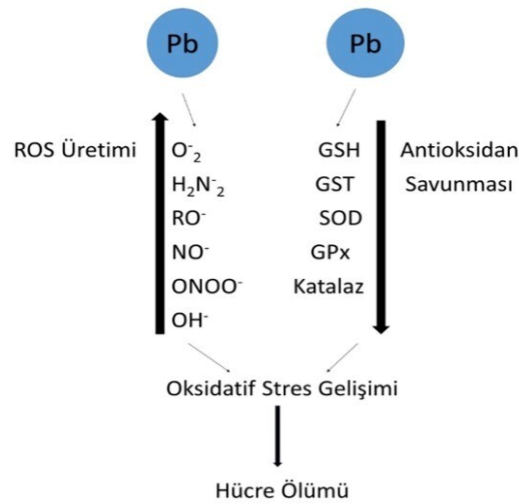
Pb’nin çevresel döngüye girişi başlıca madencilik faaliyetleri, metal işleme süreçleri ve fosil yakıtların kullanımıyla ilişkilidir; bu kaynaklardan atmosfere, suya ve toprağa yayılım gösterebilir (Collin vd., 2022). Uygulama alanları arasında piller, elektronik ve elektrikli ekipmanlar, otomotiv sektörü, mühimmat, rulman ve boru sistemleri, tekne yapımı, bazı plastik formülasyonları ve geleneksel olarak benzinin belirli katkı türleri yer alır. Ayrıca tarihsel ve/veya belirli bağlamlarda boya ve vernikler, sırlı seramikler, sofrta ve mutfak eşyaları, kozmetik ve bazı geleneksel ilaçlar gibi tüketici ürünlerinde Pb içeriğine rastlanabilmekte; elektronik atıkların uygunsuz yönetimi de ek bir maruziyet kaynağı oluşturmaktadır (Debnath vd., 2019; Obeng-Gyasi vd., 2019). Tarımsal üretimde pestisit kaynaklı kontaminasyon örnekleri bildirilmiş (Collin vd., 2022), bunun yanında sigara dumanı da bireysel maruziyete katkı sunan bir unsur olarak tanımlanmıştır (Jain vd., 2019b). Bu çoklu kaynaklar nedeniyle Pb, beşerî faaliyetlerin etkisiyle atmosfere, sulara ve toprağa yayılıp geniş bir çevresel ve halk sağlığı sorunu yaratmaktadır (Collin vd., 2022).

Pb, insan vücudu için biyolojik bir işlev taşımayan toksik bir element olmasına rağmen beyin, karaciğer, böbrek ve kemik dokularında dağılım gösterir; ayrıca kemiklerde ve dişlerde depo edilir. Yetişkinlerde ortalama Pb düzeyi yaklaşık 10 µg/dL, çocuklarda ise 1,4 µg/dL civarındadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından içme suyundaki Pb için önerilen kılavuz değer 0,01 mg/L’dir. Pb toksisitesinde en duyarlı organlardan biri sinir sistemidir. Uzun süreli maruziyet, sinir sisteminin normal işlevlerini bozmakta; daha ilerleyen dönemlerde ise beyin ve böbrek üzerinde ciddi patolojik etkilere yol açabilmektedir (Collin vd., 2022).

Pb ile karşılaşma başlıca solunum ve sindirim yoluyla gerçekleşir, ancak deri yoluyla emilim de mümkündür. Dolaşıma katılan Pb'nin büyük bir bölümü eritrositlere bağlanır, geri kalanı ise plazma ve hücrel proteinlerle etkileşir. Başlıca diş ve kemiklerde depolanır, bunun yansıra böbrek, beyin, akciğer ve karaciğerde birikebilir. Atılımı ise idrar ve dışkı yoluyla olur. Çocukluk çağında Pb'ye maruziyet, gelişen beyinde kritik ve kalıcı etkilere yol açabilir (de Souza vd., 2018). Fe eksikliği ve C vitamini alımı, Pb emilimini artırabilir, üstelik Pb zehirlenmesi maruziyetten yıllar sonra klinik bulgu verebilir (Charkiewicz vd., 2020).

Pb toksisitesi çoklu sistemleri etkiler: hipertansiyon; kolik tarzı karın ağrısı, bulantı, kusma, kabızlık veya ishal gibi gastrointestinal yakınmalar; dikkat ve konsantrasyon bozukluğu, ensefalopati dahil nörolojik disfonksiyonlar, ayrıca diyabet ve kısırlık gibi endokrin bozukluklar bildirilmiştir (Charkiewicz vd., 2020). Yüksek düzeyde Pb, hücre zarına ve DNA transkripsiyonuna zarar vererek üreme sistemini olumsuz etkiler, gebelikte hem anne hem de fetüs için ek risk oluşturur (Collin vd., 2022).

Moleküler düzeyde Pb maruziyeti ROS artışıyla seyreder. Antioksidan kapasite aşıldığında OS gelişir. Bu süreç hücrel hasarı, lipid peroksidasyonunu, kardiyovasküler hastalıkları ve kanser riskini artırır, ayrıca SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitesi baskılanır (Charkiewicz vd., 2020) (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** Pb'ye maruz kalan hücrelerde OS'nin gelişmesinin altında yatan mekanizma

(Kaynak: Collin vd., 2022).

Pb toksisitesi sinir sistemi üzerinde belirgindir. Beyinde yapısal bozulmalara yol açarak hafıza kaybı, halüsinasyonlar, dikkat dağınıklığı, felç ve hatta komaya kadar uzanan nörolojik tablolara neden olabilir. Çocuklar yetişkinlere kıyasla daha duyarlı olup maruziyet durumunda kusma, iştahsızlık, karın krampları, sinirlilik ve uyuşukluk gibi belirtiler gözlenir. Kanda Pb düzeyleri arttıkça IQ'da düşüş gözlenebildiği ve bunun Pb'nin Ca'nın yerini alarak kan-beyin bariyerini hızla geçmesi ve beyin dokusunda birikmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aşırı maruziyetin kan-beyin bariyeri disfonksiyonuna, ensefalopatiye ve kanamalara yol açabildiği, ayrıca osteoporoz riskini artırabileceği bildirilmiştir (Collin vd., 2022).

Pb maruziyetinin üreme ve endokrin sistemlerde de belirgin etkileri görülür. Erkeklerde sperm kalitesinin bozulması, kadınlarda ise düşük ve erken doğum riskinde artış bildirilmiştir. Pb'nin, sperm DNA'sını koruyan protamin HP2 proteinindeki Zn yerini alarak DNA hasarına zemin hazırladığı gösterilmiştir (Collin vd., 2022).

Hematopoietik sistemde, çok düşük düzeylerde dahi hem sentezinde görevli enzimleri inhibe ederek eritrositlerin erken yıkımına ve sonuçta anemiye yol açabildiği, kardiyovasküler açıdan kalp ritim bozukluğu, hipertansiyon, inme, koroner kalp hastalığı, sol ventrikül hipertrofisi ve periferik arter hastalığı ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir (Collin vd., 2022).

Pb maruziyetinde böbrek tutulumu ise akut ya da kronik nefropati şeklinde ortaya çıkabilir. Akut olgular şelasyon tedavisiyle gerileyebilirken, kronik olgularda glomerüller ve tübülointerstisyel düzeyde kalıcı hasar gelişebilir. Toksik maddelerin başlıca atılım organı böbrekler olduğundan Pb birikimi için ilk hedef dokulardan biridir (Rastogi, 2008). Literatürde Pb maruziyetinin interstisyel fibrozis, lökosit infiltrasyonu ve tübüler atrofiyle seyreden tübülointerstisyel nefrit ile bağlantılı olabileceği de bildirilmiştir (Qiao vd., 2025).

Tüm bu etkiler, Pb maruziyetinin nörogelişimsel, üreme, hematolojik, kardiyovasküler ve renal sonuçları nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu olduğunu ortaya koymaktadır (Rastogi, 2008; Collin vd., 2022; Qiao vd., 2025).

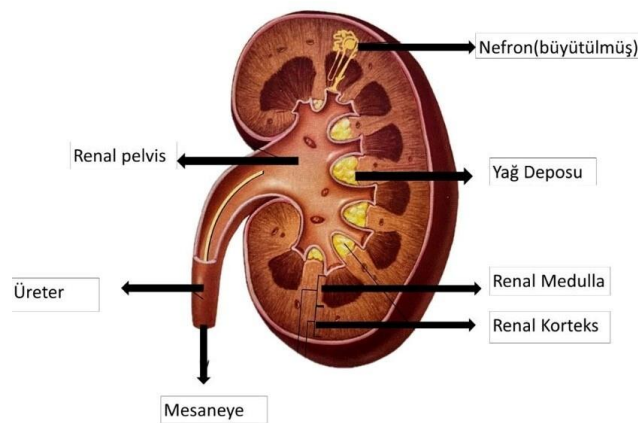
## **2.2. Böbrekler**

Boşaltım sisteminin en önemli organlarından olan böbrek, fasulye şeklinde, 130-150 g ağırlığında vücudun sağında ve solunda bulunan bir çift organdır. Sağ tarafta

bulunan böbrek, karaciğerin hemen altında olup T12-L3 omurları, solda bulunan böbrek ise T11-L2 omurları seviyesindedir. Sağdaki böbrek soldaki böbrekten biraz daha alt seviyede bulunur (Aktümsek, 2010: 346). Böbrekler dış kısım (korteks) ve iç kısımdan (medulla) oluşur (Berne vd., 2008: 624; Widmaier vd., 2010: 530) (Şekil 2.2). Bu yapılarda arter, ven, sinir, lenfler ve nefronlar bulunmaktadır. Nefronlar böbreğin işlevsel alt birimleri olup, her bir böbrekte yaklaşık 1–1,2 milyon nefron bulunur. Her nefron, böbrek cismi (glomerulus + Bowman kapsülü), proksimal tübül, Henle kıvrımı, distal tübül ve toplayıcı sistemden oluşur (Berne vd., 2008: 625). Renal hilus, böbreğin iç kısmında üreter, sinirler, lenf ve kan damarlarının böbreğe bağlantı kurduğu kısımdır. İç medullada koni şeklindeki piramitler ve onların altında papillalar bulunur. Bu papillalar renal pelvise açılan kalikslerdir (Ray vd., 2023).

Böbrekler, su alımı ve atılımını düzenleyerek vücut iç dengesinin korunmasında temel rol oynar (Aktümsek, 2010: 345; Ray vd., 2023). Uzun süreli arteriyel kan basıncını vücuttaki sodyum ve su miktarını dengeleyerek, kısa süreli arteriyel kan basıncını ise çeşitli hormon ve mediyatörleri salgılayarak kontrol eder; ayrıca asit-baz dengesini, fazlalık asitlerin atılımıyla sürdürür (Ray vd., 2023).

Böbrekler vücudun sıvı, inorganik madde ve kan hacmi dengesini düzenler (Widmaier vd., 2010: 526). Metabolik atıklar arasında kreatinin, ürik asit ve üre yer alır; ayrıca çok sayıda kimyasal ve ilaç artığı idrar yoluyla uzaklaştırılır (Ray vd., 2023; Widmaier vd., 2010: 526). Hormon olarak renin, eritropoetin ve 1,25-dihidroksivitamin D'yi (kalsitriol) salgılar; uzun süreli açlıkta glukoneojenez yoluyla aminoasitlerden glikoz üretebilir (Widmaier vd., 2010: 526).



**Şekil 2.2.** İnsan böbrek yapısı (Kaynak: Widmaier vd., 2010: 530).

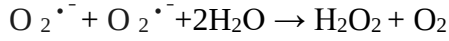
Bu homeostatik süreçler bozulduğunda sıvı-elektrolit dengesizlikleri, asit-baz bozuklukları, toksin birikimi ve kan basıncı düzensizlikleri gelişir; gerekli ve zamanında müdahale edilmezse ciddi organ yetmezliklerine ve nihayetinde ölüme yol açabilir (Ray vd., 2023).

### **2.2.1. Kurşunun böbrekler üzerine etkisi**

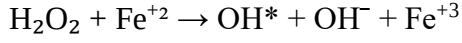
Pb toksisitesi nefrotoksositeye yol açarak böbrek fonksiyon bozukluğu ve böbrek kanseri gibi ciddi tablolara neden olabilir (Collin vd., 2022). Pb, özellikle proksimal tübül epitel hücrelerinde birikir, Pb-protein komplekslerinin oluşumu ise tübüler disfonksiyona zemin hazırlar. Bunun sonucunda glikozüri, aminoasidüri ve çeşitli iyonların taşınım kusurları ortaya çıkar; klinik olarak proksimal tübül disfonksiyonu, akut/kronik nefropati ve nadiren neoplazi/adenokarsinomlar gözlenebilir (Collin vd., 2022). Pb'nin proteinlere bağlanması, böbrek kanseri riskinde artışla ilişkilendirilmektedir (Collin vd., 2022). Ayrıca mitokondriyal Adenozin trifosfat (ATP) üretiminin baskılanması, sodyumun tübüler geri emilimini azaltarak natriürece yol açabilir (Collin vd., 2022). Bu mekanistik hasarın klinik yansıması olarak Pb maruziyetinin böbrek hastalıklarının görülme sıklığını artırdığı bildirilmiş, tahmini Glomerüler Filtrasyon Hızı (eGFR) ile idrardaki Pb düzeyi arasında anlamlı ilişki saptanmıştır. eGFR, böbreklerin kandan fazla sıvı ve atıkları süzme kapasitesini yansıttığından böbrek sağlığının temel göstergelerindendir (Jain, 2019a).

### **2.3. Oksidatif Stres**

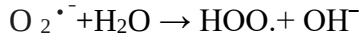
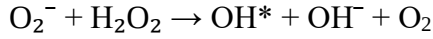
Serbest radikaller, eşleşmemiş elektrona sahip kararsız iyon, atom veya moleküllerdir. Oksijen içeren serbest radikaller ROS, azot içerenler ise reaktif azot türleri (RNS) olarak adlandırılır (Ngo vd., 2022). OS, oksijen metabolizmasının yan ürünleri ve/veya ekzojen etkenlerle artan ROS üretiminin, bunları nötralize eden antioksidan savunmayı aşması sonucu oluşan denge bozulmasıdır (Pizzino vd., 2017; Krishnamurthy vd., 2024). En bilinen ROS'lar süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil (OH) ve singlet oksijendir ( $^1O_2$ ) (Pizzino vd., 2017; Krishnamurthy vd., 2024). ROS'ların bazı oluşum reaksiyonları şöyledir:



Fenton reaksiyonu

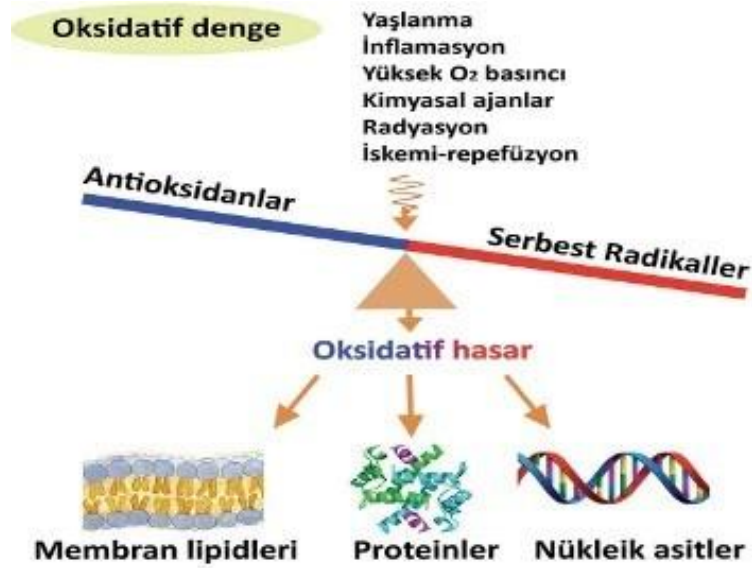


Haber-Weiss reaksiyonu



(Krishnamurthy vd., 2024).

Canlılarda ROS'a karşı işleyen endojen bir antioksidan savunma sistemi bulunur (Pizzino vd., 2017; Krishnamurthy vd., 2024). Denge korunduğu sürece bu türler zararlı değildir ve hatta hücrel sinyal yollarında rol alabilirler. Ancak antioksidan kapasite yetersiz kaldığında hücreler OS'ye girer, sonrasında ise ROS proteinler, nükleik asitler ve hücre zarı lipidlerinde hasara yol açmaya başlar (Özcan vd., 2015) (Şekil 2.3). Bunun sonucunda kanser, kardiyovasküler ve solunum sistemi hastalıkları, diyabet, nörolojik ve üreme sağlığı sorunları ile böbrek hastalıkları gibi çok sayıda patoloji gelişebilir (Pizzino vd., 2017).



**Şekil 2.3.** Antioksidan-serbest radikal dengesi ve oksidatif hasar (Kaynak: Özcan vd., 2015)

Serbest radikaller proteinler, lipidler, lipoproteinler, DNA (Pizzino vd., 2017) ve mitokondri (Forman ve Zhang, 2021: 690) gibi hücre yapılarına zarar vererek çeşitli hastalıkların oluşumuna (Pizzino vd., 2017) ve oluşan hastalıkların ilerlemesine neden olurlar (Forman ve Zhang, 2021).

### **2.3.1. Oksidatif strese bağlı kanser oluşumu**

OS, DNA bazlarının oksidatif modifikasyonu/hidrolizi ve lipid peroksidasyonu gibi süreçler yoluyla kromozomal anormalliklere ve onkogen aktivasyonuna zemin hazırlar. ROS'un neden olduğu zincir kırıkları, bazsız bölgeler (abazik siteler), protein-DNA çapraz bağları ile baz ve şeker iskeleti lezyonlarının kalıcı hale gelmesi, hücresel dönüşümü doğrudan destekler. Bu hasarın başlıca tetikleyicileri çevresel kirlenmeler, sigara dumanı ve kronik inflamasyondur (Pizzino vd., 2017). Serbest radikaller, bir yandan gerektiğinde programlı hücre ölümünü tetiklerken, öte yandan hücresel sinyal iletim ağlarında bozulmalara yol açarak tümör başlatma, ilerleme, büyüme ve metastaz süreçlerine katkıda bulunabilir (Forman ve Zhang, 2021: 690).

### **2.3.2. Kardiyovasküler hastalıklar ve oksidatif stres**

Erken endotel inflamasyonu, OS'nin artışıyla birlikte aterosklerotik süreci başlatır. Bu bölgede biriken makrofajlar ve diğer inflamatuvar hücreler ROS üretir (Pizzino vd., 2017) ve oluşan ROS, düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) oksitleyerek okside LDL (oxLDL) birikimine, köpük hücre oluşumuna ve plak progresyonuna yol açar. Böylece aterosklerotik plağın stabilitesi bozulur ve klinik olarak inme (felç) ve miyokard enfarktüsü riskini artırır (Pizzino vd., 2017; Forman ve Zhang, 2021). OS ile ilişkili bu süreçlerde endotel fonksiyonunun bozulması ve nitrik oksit (NO) biyoyararlanımının azalması da hemodinamik yükü ve vasküler hasarı derinleştirir (Forman ve Zhang, 2021).

Hipertansiyonda OS'nin arttığını gösteren biyobelirteçler arasında malondialdehit (MDA), 8-izoprostan ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yer alır. Bu belirteçlerdeki yükselme, damar duvarındaki oksidatif hasarı ve hastalığın şiddetiyle ilişkili patofizyolojik sürecin ağırlaştığına işaret eder (Forman ve Zhang, 2021).

### **2.3.3. Nörolojik hastalıklar ve oksidatif stres**

OS'nin alzheimer hastalığı (AD), parkinson hastalığı, multipl skleroz, amiotrofik lateral skleroz ve depresyon gibi nörolojik/psikiyatrik durumlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. AD'de  $\beta$ -amiloid ( $A\beta$ ) peptidinin üretimi, birikimi ve agregasyonunun ROS tarafından artırılabilirliği; buna paralel olarak beyin dokusu ve beyin omurilik sıvısında F2-izoprostanlar ile lipid peroksidasyon ürünü 4-hidroksinonenal (HNE) düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Bu bulgular, farklı beyin bölgelerinde OS yükünün arttığını ve AD patofizyolojisiyle bağlantılı olduğunu desteklemektedir. Ayrıca AD'li hastalarda nükleer ve mitokondriyal DNA oksidasyon belirteçlerinin yükseldiği rapor edilmiştir (Pizzino vd., 2017; Forman ve Zhang, 2021). Öte yandan alkol gibi bazı OS kaynaklarının apoptozu tetikleyerek hücrel sitotoksiteyi artırabildiği de gösterilmiştir (Battistelli vd., 2016).

### **2.3.4. Solunum sistemi hastalıkları ve oksidatif stres**

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ve astım gibi hastalıkların OS ile ilgisinin olduğu bildirilmiştir (Pizzino vd., 2017). Yapılan bazı çalışmalarda KOAH 'lı bireylerin hastalık seyri artıkça lipid peroksidasyonu ile oksidanların sayısında sürekli artış görülmüştür. OS, nötrofil elastaz etkinliğini azaltarak KOAH'n ilerlemesine neden olmaktadır. Ayrıca idiyopatik pulmoner fibrozisli hastalarla yapılan çalışmalarda OS belirteci olan 8-izoprostan, 8-izoprostaglandin, etan ve  $H_2O_2$  gibi maddelerde artış olduğu tespit edilmiştir (Forman ve Zhang, 2021: 690).

### **2.3.5. Romatoid artrit ve oksidatif stres**

Romatoid artritte inflamasyon odaklarında serbest radikal düzeylerinin artmış bulunması, hastalığın patogenezinde OS'nin rolüne işaret etmektedir (Pizzino vd., 2017).

### **2.3.6. Cinsel olgunlaşma ve oksidatif stres**

Cinsel olgunlaşma süreci hipotalamus-hipofiz-gonad (HHG) ekseninin hassas nöroendokrin düzeniyle yürür. Bu dönemde artan oksidatif yük, hem merkezi (GnRH/LH/FSH salınımı) hem de periferik (gonadal steroidogenez) düzeyde işlevleri bozabilir. Aşırı ROS leydig ve sertoli hücrelerinde mitokondriyal işlevi ve steroidogenez enzimlerini zedeleyerek testosteron biyosentezini azaltabilir. Kadınlarda ise

folikülogenez ve oosit olgunlaşmasında DNA, protein ve membran lipid hasarı yoluyla kaliteyi düşürür ve apoptozu artırır (Pizzino vd., 2017). Çocukluk çağında ağır metallere, özellikle Cd'ye maruziyetin puberte zamanlamasını geciktirebildiği bildirilmiştir. Bu etki OS ve endokrin bozucu mekanizmaların birleşik sonucu olarak yorumlanmaktadır (Pizzino vd., 2017).

Erişkin dönemde de OS, üreme hücre kalitesini düşürür. Spermden motilite, morfoloji ve DNA bütünlüğünde bozulma, oositte ise maturasyon ve embriyo gelişim potansiyelinde azalma gözlemlenebilir (Battistelli vd., 2016). Pb gibi ağır metallerin üreme sistemi üzerindeki toksik etkileri, DNA/protein oksidasyonu ve antioksidan enzimlerin baskılanması üzerinden hem erkek fertilitasını (sperm kalitesi, DNA hasarı) hem de gebelik sonuçlarını (düşük, erken doğum riski) olumsuz etkileyebilir (Collin vd., 2022).

Özetle, gelişim çağındaki çevresel/mesleki maruziyetler ve kronik inflamasyon kaynaklı OS, puberte zamanlamasını ve üreme kapasitesini olumsuz etkileyebilir. Riskin azaltılması antioksidan savunmayı destekleyen yaşam tarzı müdahaleleri ve ağır metal maruziyetinin en aza indirilmesiyle mümkün olabilir (Pizzino vd., 2017; Battistelli vd., 2016; Collin vd., 2022).

### **2.3.7. Böbrek hastalıkları ve oksidatif stres**

Böbrek, vücut sıvılarının süzülmesi, gerekli maddelerin geri emilimi, homeostazın sürdürülmesi ve atık ürünlerin uzaklaştırılması gibi hayati işlevleri yürütür. Bu yüksek metabolik yük nedeniyle böbrek dokusu, en yoğun mitokondri içeren organlardan biridir. Mitokondride ATP üretimi sırasında ortaya çıkan elektron kaçakları ROS oluşumuna yol açar; nitekim pek çok böbrek hastalığında mitokondri kaynaklı ROS düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. ROS birikimi hücre yapısı ve işlevleri bozarak zaman içinde hücre ölümüne ve organ düzeyinde yetmezliğe ilerleyebilir; bu oksidatif yük hipertansiyon, ateroskleroz, inflamasyon ve kronik böbrek hastalığı riskinde artışla ilişkilendirilmiş ve mortaliteyi etkileyebileceği bildirilmiştir (Ho & Shirakawa, 2022).

Serbest radikallerin proteinüri, üremi, tübülointerstisyel nefrit, glomerulointerstisyel nefrit ve böbrek yetmezliği gibi birçok böbrek hastalığının patogenezinde rol aldığı bildirilmiştir (Pizzino vd., 2017). OS mezangial genişleme, endotelial disfonksiyon, glomerüler skleroz, tübülointerstisyel fibrozis ve apoptozu yol açabilir, ayrıca artan sitokin üretimi üzerinden böbrek fonksiyonlarını olumsuz etkiler

(Verma vd., 2021). Bu süreçte OS, NF- $\kappa$ B aracılığıyla proinflatuvar sitokinlerin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) üretimini artırır, inflamatuvar hücre birikimini ve inflamasyonun sürmesini kolaylaştırır, devamında hücre dışı matriks üretimini düzenleyen TGF- $\beta$ 'nin artışı fibrotik yanıtı güçlendirir. İlerleyen olgularda bu kaskad böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilir.

Ayrıca bazı ilaçlar (ör. gentamisin, bleomisin, takrolimus, siklosporin) lipid peroksidasyonunu tetikleyerek oksidatif mekanizmalar üzerinden nefrotoksisite oluşturabilir. Pb başta olmak üzere bazı ağır/geçiş metalleri de oksidatif hasar ve ilişkili yollarla nefropatiye ve çeşitli kanserlere zemin hazırlayabilir (Pizzino vd., 2017).

## **2.4. Antioksidanlar**

Antioksidanlar, metabolizma sırasında oluşan serbest radikallerin yol açabileceği hasarı geciktirme ya da engelleme kapasitesine sahip bileşikler olup lipid peroksidasyonunu baskılayarak pek çok kronik hastalığın ilerlemesini yavaşlatırlar (Gülçin vd., 2020). Ayrıca oksidatif hasarın sınırlandırılması ve onarım süreçlerinin desteklenmesi yoluyla doku bütünlüğünün korunmasına da katkı sağlarlar (Özcan vd., 2015).

Canlıyı serbest radikallerden koruyan antioksidanlar iki ana grupta incelenir: endojen ve ekzojen. Endojen antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşur. Enzimatik olanlara SOD, CAT, GPx ve glutatyon redüktaz (GR) örnek verilebilir. Enzimatik olmayanlara ise ürik asit, melatonin, bilirubin, koenzim Q10, glutatyon (GSH), alfa-lipoik asit, seruloplazmin ve transferrin gibi moleküller dahil olup selenyum ise antioksidan selenoproteinlerin (ör. GPx) esansiyel bir kofaktörüdür. Ekzojen antioksidanlar başlıca ilaç temelli ve vitamin/fitokimyasal kökenli bileşenleri kapsar. Vitamin antioksidanlara askorbik asit (C vitamini), tokoferoller/tokotrienoller (E vitamini) ve folat (B9 vitamini) örnek olarak verilebilir. Beta-karoten ise A vitamininin öncülüdür (provitamin A) ve ince bağırsakta ihtiyaca göre retinole dönüştürülür,  $^1O_2$ 'yi söndürerek antioksidan etki gösterir (Karabulut & Gülay, 2016).

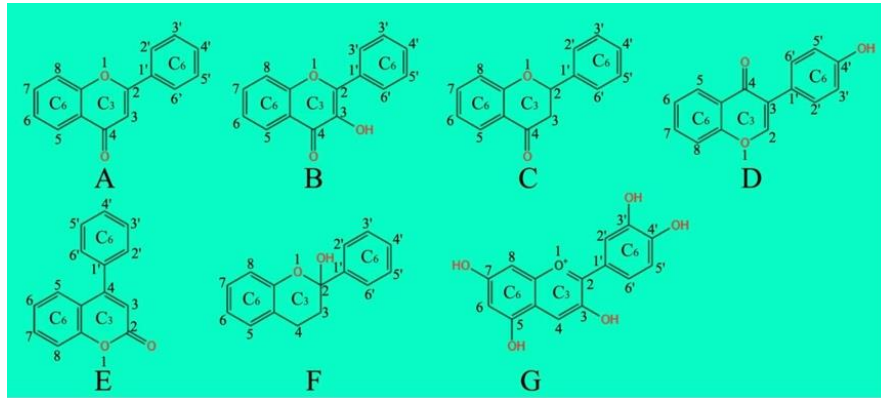
## **2.5. Flavonoidler**

Flavonoidler, çok sayıda bitki türünün meyve, sebze, sap, yaprak, kuruyemiş, tahlıl tanesi ve çiçek dokularında bulunan, biyolojik süreçlerde oluşan serbest radikalleri süpürerek dolayısıyla antioksidan etki gösteren bileşiklerdir. Günümüze kadar 10.000'i

aşkın flavonoid tanımlanmıştır. Hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde çeşitli hücresel olaylarda rol alıp kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar üzerinde umut verici antioksidan ve biyolojik etkiler göstermişlerdir. Tıbbi, kozmetik, farmasötik ve nutrasötik alanlarında temel bir bileşik sınıfıdır. Oksidatif, inflamatuvar, mutajenik ve karsinojenik süreçlerle savaşıyor, ayrıca çeşitli enzimlerin aktivitesini modüle eder. Bitkilerde tozlaşma, oksin taşınması, çiçek renklenmesi, erkek üreme başarısı ve tohum gelişimi gibi süreçlerde de işlev görür.

Flavonoidler bitki hücrelerinde çoğunlukla vakuollerde O-glikozit veya C-glikozit türevleri halinde bulunurlar. Genel yapıları 15 karbon atomundan oluşan C<sub>6</sub>–C<sub>3</sub>–C<sub>6</sub> iskeletine sahip üç halkalı bir çekirdektir ve fenilpropanoid metabolik yoluyla biyosentezlenirler. Bitkilerin koku, tat ve renk özelliklerine katkı sağlar, ayrıca ultraviyole radyasyon, tuzluluk, ağır metaller, kuraklık ve soğuk gibi abiyotik streslere karşı korumaya yardımcı olurlar (Chen vd., 2023).

Flavonoidler, C halkasının oksidasyon durumu, doymamışlık derecesi ve kimyasal yapılarına göre yedi alt sınıfa ayrılır: flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonoidler, neoflavonoidler, flavanoller (flavan-3-oller) ve antosiyaninler (Chen vd., 2023; Zhuang vd., 2023) (Şekil 2.4).

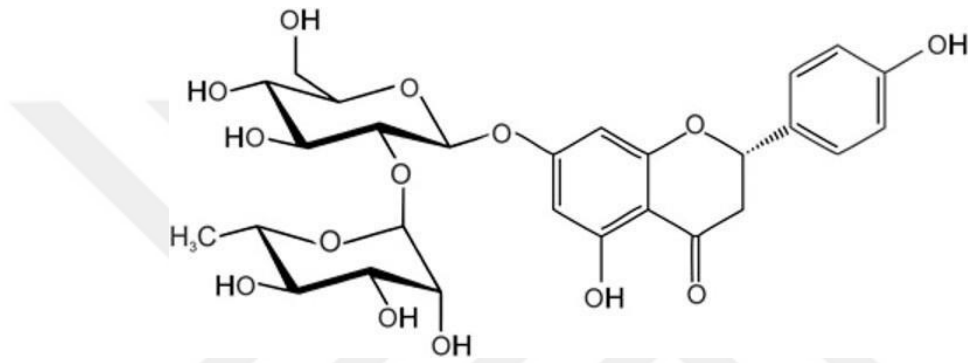


**Şekil 2.4.** Flavonoidlerin sınıflandırılması. (A) Flavonlar, (B) Flavonoller, (C) Flavanonlar, (D) İzoflavonoidler, (E) Neoflavonoidler, (F) Flavanoller (flavan-3-oller) ve (G) Antosiyaninler (**Kaynak:** Zhuang vd., 2023).

### 2.5.1. Naringin

N, flavanon naringenininden türetilmiş bir flavanon glikozitidir (Ghanbari-Movahed vd., 2021). Adının kökeni büyük olasılıkla Sanskritçe/Hinduca “portakal” anlamına gelen “narangi” sözcüğüne dayanır (Alam vd., 2022). Kimyasal olarak 4',5,7-

trihidroksiflavanon-7-ramnoglukozit (C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>; molekül ağırlığı: 580,5) yapısındadır ve genellikle naringenin-7-O-ramnoglukozit olarak da anılır (Şekil 2.5). Başta turunçgiller olmak üzere birçok bitki türünde bulunur. Naringenin türevi olan N turunçgillerin karakteristik acılığından sorumludur (Ghanbari-Movahed vd., 2021). Tarihsel olarak N, 1857’de De Vry tarafından Java’da yetişen bir greyfurt çiçeğinde gözlemlenmiş, kimyasal yapısı ise ilk kez 1928’de Inubuse ve Asahina tarafından ortaya konulmuştur (Alam vd., 2022).



**Şekil 2.5.** *Naringenin kimyasal yapısı* (Kaynak: Ghanbari-Movahed vd., 2021)

Kardiyovasküler, metabolik/genetik, nörolojik ve iskelet sistemi üzerinde yararlı etkilerinin yanı sıra ayrıca anti-ülser aktivitesi de bulunan N, gastrointestinal sistemin mukozal bariyerini güçlendirerek oksidatif stres kaynaklı hasarı azaltmakta ve inflamatuvar yanıtı baskılamaktadır. Bu özellikleri sayesinde hem terapötik potansiyeli yüksek bir ajan hem de çeşitli hastalıkların önlenmesinde destekleyici bir biyoaktif bileşik olarak değerlendirilmektedir (Rivoira vd., 2021). Beslenmede N alımının yüksek olduğu popülasyonlarda akciğer kanseri riskinin azaldığına dair bulgular mevcuttur (Ghanbari-Movahed vd., 2021). Kanser, hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu ve malign tümör oluşumuna ilerleyebilen karmaşık bir süreç olduğundan, mevcut tedavilerde gelişen direnç ve yan etkiler göz önüne alındığında N ve diğer flavonoidlerin kemopreventif ve tamamlayıcı terapötik potansiyeli dikkat çekmektedir. Flavonoidler, çok çeşitli meyve ve sebzelerde bulunan geniş bir polifenol sınıfıdır ve hem kanser riskini azaltma hem de tümör biyolojisini modüle etme yönünde umut verici sonuçlar vermektedir (Ghanbari-Movahed vd., 2021).

Deneyisel model olan sıçanlarda böbrek hasarı sırasında N’nin böbrek fonksiyon bozukluğuna karşı koruyucu etki gösterdiği, antioksidan enzimleri desteklediği, TNF- $\alpha$

düzeylerini ve nitrit artışlarını azalttığı saptanmıştır (Alam vd., 2022). N'nin terapötik etkileri, çeşitli protein ve enzimlerin ekspresyonunu/aktivitesini modüle etmesiyle ilişkilidir. Osteojenik farklılaşmayı ve hücre proliferasyonunu etkileyebildiği, inflamatuvar yanıtla ilişkin sinyal yollarının [örneğin NF- $\kappa$ B ve Mitogenle Aktive Edilen Protein Kinaz (MAPK)] aktivitesini azalttığı gösterilmiştir. Serbest radikal oluşumunu ve OS belirteçlerini düşürerek DNA hasarını azalttığı bilinmektedir. Ayrıca AD, parkinson hastalığı ve epilepsi gibi merkezi sinir sistemi bozukluklarında nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir. N, malign hücreleri baskılama, apoptozu indüklemeye, hücre döngüsünü durdurma, OS'yi azaltma, inflamasyonu ve anjiyogenezi modüle etme gibi çoklu mekanizmalar üzerinden antikanser etki gösterebilir (Ghanbari-Movahed vd., 2021). Deneysel çalışmalarda, böbrek hasarında ROS kaynaklarını sınırlayarak belirgin renoprotektif etki sağladığı rapor edilmiştir (Alam vd., 2022).

## **2.6. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) /Akt Yolağı**

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolağı kanser, kardiyovasküler, immünolojik, nörolojik hastalıklar ve diyabette hücresel kaderi belirleyen temel bir hücre sinyal yolağıdır. PI3K/Akt yolağı hücre döngüsü ilerlemesi, protein sentezi, farklılaşma, büyüme, metabolizma ve anti-apoptotik yanıtların düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar (Fruman vd., 2017; Küpeli vd., 2022; Miricescu vd., 2021). Bu yolun uygunsuz veya aşırı aktivasyonu tümör gelişimi, metastaz ve tedavi direnci gibi onkogenik süreçlere katkı sağlayabilir (He vd., 2021).

PI3K; hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinlerin bağlandığı reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar) ile G-protein bağlantılı reseptörler (GPCR'ler) üzerinden aktive olur. Bu aktivasyon sonucunda PI3K membran fosfolipidlerinden PIP2'yi PIP3'e dönüştürerek aşağı akıştaki efektörleri için bir platform oluşturur (Shi vd., 2019; Miricescu vd., 2021; Martini vd., 2014; He vd., 2021). PI3K ailesi üç sınıftır: Sınıf I PI3K'lar bir katalitik (p110) ve bir düzenleyici (p85) alt birim içerir. p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\gamma$  ve p110 $\delta$  izoformları sırasıyla PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG ve PIK3CD genleri tarafından kodlanır ve özellikle PIK3CA çok sayıda kanser türü ile ilişkilendirilmiştir (Martini vd., 2014). Sınıf II PI3K'ların belirgin bir düzenleyici alt birimi yoktur. C2 $\alpha$ , C2 $\beta$  ve C2 $\gamma$  izoformları lipid ürünler üretir ve bu ürünler kanser biyolojisinde önemlidir. PI3KC2 $\gamma$  başlıca karaciğerde eksprese olurken, PI3KC2 $\alpha$  ve PI3KC2 $\beta$  geniş bir doku dağılımı sergilemektedir.

PI3K $\alpha$ 'nın ise meme kanserinde belirgin bir önemi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Sınıf II enzimler PIP3 üretmez, PIP ve PIP2 üretir (Martini vd., 2014). Sınıf III PI3K (PIK3C3/VPS34) bir düzenleyici ve bir katalitik alt birimle otofajide, özellikle otofagozom oluşumu ve genişlemesinde kritik rol oynar. Amino asit sinyalleriyle aktive olduğunda protein kinazlarını etkileyerek dolaylı sinyalleme mekanizmaları oluşturabilir. (He vd., 2021).

Akt; serin/treonin kinaz olup Akt1, Akt2 ve Akt3 izoformlarından oluşur. Akt'nin düzenlenmesindeki bozuklukların pek çok hastalıkla, özellikle kanserle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Akt1 birçok dokuda eksprese olabilirken, Akt2 tümör hücrelerinin invazyon/dağılımında etkili olup pankreas kanserinde artabilir. Akt3 ise beyinde yüksek düzeyde bulunurken, meme ile prostat kanserinde aşırı eksprese edilmektedir.

Akt; RTK, GPCR ve İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) aracılı sinyallerle aktive edilir (He vd., 2021). Aşağı akışta Akt hücre döngüsü, metabolizma ve hayatta kalma üzerinde etkili Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Forkhead box O (FOXO) ve mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) gibi hedefleri fosforile ederek proliferasyon ve anti-apoptotik yanıtları güçlendirir (Fruman vd., 2017; Miricescu vd., 2021).

Rapamisin memeli hedefi (mTOR), serin/treonin kinaz yapısında olup hücrenin stres altında hayatta kalması, büyümesi ve kontrolsüz çoğalmasında önemli bir düğümdür. mTOR genindeki mutasyonlar veya aşırı aktivite, özofagogastrik ve endometriyal karsinomlardan kolorektal, renal hücreli ve mesane kanserlerine, melanomlara kadar farklı kanserlerde aşırı ifade ve büyüme avantajıyla ilişkilendirilmiştir (Peng vd., 2022). mTORC2, Akt'nin tam aktivasyonu için gerekli fosforilasyon basamağını desteklerken, mTORC1 protein sentezi ve hücre büyümesini artıran translasyonel programları tetikler (Fruman vd., 2017; Miricescu vd., 2021).

Sinyal akışının bütününde, RTK'lar RAS aracılığıyla, GPCR'ler ve B hücre reseptör adaptörleri (BCR'ler) üzerinden, IGF-1 ise IGF1R eksenine doğrudan Sınıf I PI3K'ları aktive eder. Bunun yanında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve T hücre reseptörü (TCR) sinyalleri Sınıf II PI3K'ların devreye girmesini sağlarken, amino asit sinyalleri Sınıf III PI3K'ları uyarır. Aktive PI3K, plazma membranında PIP2'yi PIP3'e dönüştürür. Oluşan PIP3, 3-fosfoinozotid bağımlı kinaz-1 (PDK1) ve küçük GTPaz RAC'ın desteğiyle Akt'nin membrana taşınmasını ve aktivasyonunu kolaylaştırır.

PI3K/Akt yolağının doğal frenleyicisi PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog)'dir. PTEN, PIP3'ü PIP2'ye defosforile ederek PI3K/Akt sinyallemesini tersine çevirir ve tümör baskılayıcı etki gösterir. PTEN'in işlev kaybında, Akt dış uyarana olmadan dahi aktif kalabilir (He vd., 2021; Miricescu vd., 2021). PTEN'in protein fosfataz aktivitesi ayrıca belirli protein substratlarını, lipid fosfataz aktivitesi ise PIP3 gibi lipidleri hedefleyerek tümör baskılayıcı etkisini güçlendirir (Bu vd., 2021) (Şekil 2.6).

18

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanları ve Yapılan Uygulamalar

Çalışmada toplam 28 adet 200-250 g ağırlığında yetişkin erkek wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Adıyaman Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan etik izin sonrasında (Protokol No #2024/022) (EK-1), Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden elde edilen sıçanlar, verilecek indükleyici ve koruyucu ajanlara göre randomize bir şekilde 4 eşit gruba bölündü (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Deney grupları ve yapılan uygulamalar

| Deney Grupları                                   | Yapılan Uygulamalar                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kontrol (K) grubu, n = 7                         | Hiçbir uygulama yapılmadı.                                                                                                              |
| Naringin (N) grubu, n = 7                        | 40 mg/kg naringin 30 gün boyunca gavaj yolla uygulandı (Turgut vd., 2016).                                                              |
| Kurşun asetat (PbAc) grubu, n = 7                | Kurşun asetat, 30 gün boyunca 500 ppm olacak şekilde içme suyuna karıştırılarak uygulandı (Ozkaya vd., 2018).                           |
| Kurşun asetat + Naringin grubu (PbAc + N), n = 7 | 40 mg/kg naringin 30 gün boyunca gavaj yolla uygulandı. Ayrıca içme suyuna 30 gün boyunca 500 ppm olacak şekilde kurşun asetat verildi. |

Sıçanlar, çalışma boyunca telli kafeslerde barındırıldı ve standart laboratuvar yemi ve musluk suyu ad libitum olarak verildi. Deney ortamı,  $24 \pm 2$  °C sıcaklık, %40–50 bağıl nem ve 12:12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü koşullarında standardize edildi.

Otuz günlük uygulama periyodunun ardından, 31. günde sıçanlara Ketamin/Xylazine (100 mg/kg / 10 mg/kg) anestezisi uygulandı. Biyokimyasal analizler için intrakardiyak yolla kan örnekleri (Şekil 3.1) alındıktan sonra, hayvanlar anestezisi altında sakrifiye edildi. Sakrifikasyonun ardından, element analizi, enzimatik ve non-enzimatik aktiviteler, gen ekspresyonu ve histolojik değerlendirme amacıyla böbrek doku örnekleri (Şekil 3.2) hızlı bir şekilde alındı ve çalışma yapılmıyaya kadar -80 °C'de saklandı.



**Şekil 3.1.** *Sıçanlardan intrakardiyak yolla kan numunelerin alınması*



**Şekil 3.2.** *Sıçanlardan böbrek doku örneklerinin alınması*

### **3.2. Biyokimyasal Analizler**

Sıçanların intrakardiyak yolla alınan kan örnekleri 4500 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek serumun ayrılması sağlandı. Elde edilen serumlarda üre ve kreatinin seviyeleri ticari Abbott kitleri ve Abbott Labs Architect C16000 sistemi (Abbott GmbH & Co, Germany) kullanılarak ölçüldü.

### **3.3. Element Analizi**

#### **3.3.1. Element analizinde kullanılan ekipmanlar ve reaktifler**

Çalışmadaki element analizinde analitik saflıkta reaktifler kullanıldı. Ultra saf deiyonize su (18,2 MΩ direnç), Milli-Q Plus su arıtma sistemi (Millipore, Bedford, MA, ABD) ile elde edildi. Deneylerde kullanılan tüm kaplar, %10 (v/v) nitrik asit çözeltisinde 24 saat bekletilerek temizlendi ve ardından deiyonize su ile iyice durulandı. Kalibrasyon standartlarının hazırlanmasında, 1000 µg mL<sup>-1</sup> stok çözelti %0,2 (v/v) HNO<sub>3</sub> içinde uygun şekilde seyreltildi. Metal analizleri, Analytik Jena ContrAA 300 (GLE, Berlin, Almanya) model yüksek çözünürlüklü sürekli kaynaklı alevli atomik absorpsiyon spektrometresi (HR CS FAAS) ile gerçekleştirildi.

#### **3.3.2. Böbrek dokularının çözünürleştirilmesi**

Böbrek dokularının element analizine yönelik olarak, yaklaşık 0,35-0,40 g aralığındaki örnekler 100 ml hacimli, sıcaklık ve basınca dayanıklı politetrafloretilen (PTFE) kaplar içerisinde mikrodalga fırında çözünürleştirildi. Her bir örnek PTFE kaplara yerleştirildikten sonra üzerine 5 ml %65’lik nitrik asit (HNO<sub>3</sub>), 1 mL %72’lik perklorik asit (HClO<sub>4</sub>) ve 1 mL %30’luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklendi. Bu karışım mikrodalga yöntemiyle 30 dk boyunca çözünmeye bırakıldı. İşlem sonrasında kaplar oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve elde edilen berrak çözelti 0,1 mol/L HNO<sub>3</sub> ile 10 mL’ye tamamlandı (Çiftçi vd., 2024). Örneklerin tamamen çözünmemesi durumunda mikrodalga çözünürleştirme işlemi tekrar edildi.

Tamamen çözünmüş ve berrak hale gelmiş doku örnekleri, Analytik Jena ContrAA 300 (GLE, Berlin, Almanya) model HR CS FAAS ile analiz edildi. Cihaza ait çalışma ölçüm değişkenleri Tablo 3.2’de gösterildi.

**Tablo 3.2.** HR CS-FAAS cihazına ait ölçüm değişkenleri

| Değişkenler                                                    | Cu     | Fe     | Zn     | Pb     | Mn     | Mg     | Ca     |
|----------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Dalga boyu (nm)                                                | 324.75 | 248.32 | 213.85 | 217.00 | 279.48 | 285.20 | 422.67 |
| N <sub>2</sub> O-C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> akış hızı (L/h) | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 0      | 210    |
| C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -Hava akış hızı (L/h)            | 50     | 60     | 55     | 70     | 80     | 70     | 80     |
| Alev başlığı yüksekliği (mm)                                   | 6      | 5      | 9      | 8      | 8      | 5      | 6      |
| Değerlendirme pikselleri (pm)                                  | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      | 3      |

Kalibrasyon eğrilerinin hazırlanmasında, 1000 mg/L derişime sahip olan metal stok çözeltileri (Merck) uygun hacimlerde alınarak istenen derişimlere seyreltildi. Analiz edilen metaller için elde edilen kalibrasyon parametreleri Tablo 3.3’de gösterildi.

**Tablo 3.3.** Metallerin kalibrasyon denklemleri ile korelasyon katsayıları

| Metal | Kalibrasyon Eşitliği (mg/L) | Korelasyon Katsayısı (R <sup>2</sup> ) |
|-------|-----------------------------|----------------------------------------|
| Cu    | $y=0,1336X+0,0032$          | 0,9984                                 |
| Fe    | $y = 0,028x + 0,0014$       | 0,9989                                 |
| Zn    | $y = 0,3227x + 0,0279$      | 0,9959                                 |
| Pb    | $y = 0,0223x + 0,0007$      | 0,9992                                 |
| Mn    | $y = 0,0759x + 0,0005$      | 0,9995                                 |
| Mg    | $y = 0,3151x + 0,0515$      | 0,9847                                 |
| Ca    | $y = 0,0982x + 0,0144$      | 0,9959                                 |

### 3.4. Toplam Protein, Enzim ve Non-Enzimatik Aktivite Analizleri

Ratlardan alınan böbrek dokuları, teflon başlı bir homojenizatörle (Heidolph RZR 2021) 0.1 M potasyum fosfat tamponu (0.5 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7.4) içerisinde (1: 4 (w / v) oranında) homojenize edildi. Homojenatlar, 4 °C’de 16.000 x g’de 20 dk boyunca Hettich 460 R model santrifüjde santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatantlar, toplam protein miktarı tayini ve enzim aktivite analizleri için ependorf tüplere aktarıldı. Ölçümler, Thermo Varioskan Flash 2000 mikropilaka okuyucu spektrofotometrede her örnek için üçlü tekrar halinde gerçekleştirildi.

### 3.4.1. Toplam protein tayini

Böbrek dokularındaki toplam protein konsantrasyonları, Bradford (1976) yöntemi kullanılarak tespit edildi. Bu yöntemde, süpernatant örnekleri uygun şekilde seyreltildi ve her bir kuyucuğa 5 µL numune ve ardından 250 µL Bradford reaktifi ilave edildi. Karışımlar oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 15 dk inkübe edildikten sonra oluşan renk değişimi 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbans ile değerlendirildi. Hesaplamalarda seyreltme faktörü dikkate alınarak süpernatantlardaki toplam protein miktarları belirlendi. Enzim aktiviteleri ise, toplam protein düzeyleri belirlendikten sonra spesifik aktivite ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg toplam protein}^{-1}$ ) cinsinden ifade edildi.

### 3.4.2. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Tüm enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçümleri, böbrek dokularının homojenizasyonu ve santrifüjlenmesinin hemen ardından, örnekler bekletilmeden Thermo Varioskan Flash 2000 mikrolaka okuyucu ile gerçekleştirildi. Ölçümler sırasında, her bir örnek için üç kez absorbans değeri okundu ve aynı örneğe ait ölçümler arasında %10'dan fazla fark tespit edilmesi durumunda analiz tekrarlandı. Tüm enzim aktiviteleri örneklerin toplam protein düzeyleri belirlendikten sonra, spesifik aktivite ( $\text{nmol/dk/mg toplam protein}$ ) olarak raporlandı.

#### 3.4.2.1. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi

Süpernatantlardaki asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem uygulandı. Analizlerde, Ellman vd. (1961) tarafından tanımlanan ve Özmen vd. (1998) tarafından modifiye edilerek mikrolaka okuyucuya uyarlanan protokol kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümünde substrat olarak asetiltiyokolin iodid (ACTI) tercih edildi ve reaksiyon sonucunda oluşan renk değişimi izlendi. Sıçanların böbrek dokularından elde edilen süpernatant örneklerinden 10 µL'lik örnekler her bir mikrolaka kuyucuğuna pipetlendi. Ardından son reaksiyon karışımında 0.701 mM ACTI ve 0.136 mM 5,5-Dithio-Bis-2-Nitrobenzoic Asit (DTNB) içerecek şekilde 0.1 M trizma tamponu (pH 8.0, Sigma-Aldrich, T8483) ile hazırlanmış 200 µL'lik karışım eklendi. Karışımlar mikrolaka okuyucuya yerleştirildikten sonra 10 sn boyunca çalkalandı ve 25°C'de, 1 dk süreyle 412 nm dalga boyunda absorbans değişimi

kaydedildi. Elde edilen verilerle, spesifik AChE aktivitesi nmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (412 nm’de DTNB için  $\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### **3.4.2.2. Karboksilesteraz (CaE) aktivitesi**

Böbrek dokularının homojenizasyonu sonrasında elde edilen süpernatant örneklerinde Karboksilesteraz (CaE) aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, spektrofotometrik yöntem mikrolaka okuyucuya adapte edildi. Aktivite ölçümlerinde substrat olarak, %96’lık etanolde hazırlanmış 26 mM p-nitrofenil asetat (PNPA) kullanıldı (Santhoshkumar ve Shivanandappa, 1999). Analiz için her bir mikrolaka kuyucuğuna 5  $\mu\text{L}$  örnek ve 250  $\mu\text{L}$  0.05 M trizma tamponu (pH 7.4, Sigma-Aldrich, T7693) eklendi ve karışım 25°C’de 3 dk ön inkübasyona bırakıldı. Ardından, son konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde 5  $\mu\text{L}$  PNPA ilave edildi. Reaksiyonun başlamasıyla birlikte 2 dk boyunca 405 nm dalga boyunda distile suya karşı absorbans değişimi kaydedildi. Elde edilen verilerle spesifik CaE aktivitesi nmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (405 nm’de PNPA için  $\epsilon=1830 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### **3.4.2.3. Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi**

Elde edilen süpernatantlarda glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesinin ölçümü için mikrolaka okuyucu sistem kullanıldı. Analizlerde substrat olarak, %96’lık etanolde hazırlanmış 20 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) tercih edildi. Yöntem olarak, Habig vd. (1974)’nin geliştirdiği protokol bazı değişikliklerle uygulandı. Reaksiyon karışımında kofaktör olarak 0.002 M redükte GSH kullanıldı. Her bir mikrolaka kuyucuğuna sırasıyla 10  $\mu\text{L}$  süpernatant, 100  $\mu\text{L}$  fosfat tamponu (0.1 M, pH 6.5) ile 100  $\mu\text{L}$  GSH karışımı ve son olarak 10  $\mu\text{L}$  CDNB eklendi. Karışımlar mikrolaka okuyucuya yerleştirildikten sonra 15 sn boyunca karıştırıldı ve ardından 25°C’de 2 dk boyunca 344 nm dalga boyunda absorbans değişimi izlendi. Elde edilen veriler kullanılarak, spesifik GST aktivitesi nmol/dk/mg protein olarak hesaplandı (344 nm’de CDNB için molar absorptivite katsayısı  $\epsilon=9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  olarak alındı).

#### **3.4.2.4. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi**

Elde edilen süpernatantlarda GR aktivitesi tayini mikrolaka sistemi ile ölçüm yöntemine göre yapıldı (Cribb vd., 1989). Reaksiyon solüsyonu 0.1 mM, 150  $\mu\text{L}$  5,5-

dithio-bis-2-nitrobenzoic asit (DTNB), 1.2 mM 20 µL NADPH ve 20 µL örnek içermektedir. 20 µL 3.25 mM oksitlenmiş glutatyonun (GSSG) ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Bütün çözeltiler, 1 mM EDTA içeren, 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) hazırlandı. Reaksiyon ilerledikçe GSSG'den GSH oluşumu nedeniyle azalan DTNB miktarı oda sıcaklığında 3 dk süre ile 405 nm'de izlendi ve elde edilen absorbans değerlerinden spesifik GR aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı. (405 nm'de DTNB için  $\epsilon=14151 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### **3.4.3. Non-enzimatik aktivitelerin belirlenmesi**

#### **3.4.3.1. Malondialdehit (MDA) miktarının tayini**

MDA düzeyi, Placer vd. (1966) tarafından tanımlanan ve tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaktif maddelerin oluşumuna dayanan yöntemle ölçüldü. Analizde, MDA-TBA kompleksinin oluşturduğu renk değişimi 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar ıslak doku ağırlığının gramı başına nmol (nmol MDA/mg ıslak doku) cinsinden ifade edildi.

#### **3.4.3.2. Redükte glutatyon (GSH) miktarının tayini**

Redükte GSH seviyesi, Moron vd. (1979) tarafından geliştirilen yöntemin mikropılaka okuyucuya adapte edilmiş protokolü ile belirlendi. Analizlerde, örneklerin 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri, GSH standart eğrisi kullanılarak değerlendirildi ve sonuçlar nmol GSH mg protein<sup>-1</sup> olarak hesaplandı.

### **3.5. Gen Ekspresyonu Analizi**

#### **3.5.1. RNA izolasyonu**

PI3K ve Akt genlerinin ekspresyon düzeylerine bakmak için ilk önce sıçanlardan alınan böbrek dokularından toplam RNA izole edildi. İzolasyon aşamaları şu şekilde yapıldı:

1. Böbrek dokuları ilk önce miRNAExtractor (Biobasic SK8811) ile bir tüp içerisinde homojenize edilip 5-10 dk inkübe edildi.
2. Daha sonra homojenatların üzerine 0,2 mL kloroform eklenerek 30 sn boyunca vortekslenme yapıldı.

3. Vortekslenme işleminden sonra tüpler 4°C'de 10 dk boyunca 12.000 x g'de santrifüj (Hettich Mikro 200) edildi.
4. Santrifüj işleminden sonra tüpte meydana gelen 3 farklı fazdan en üstteki renksiz sulu faz olan RNA (yaklaşık 540 µL) temiz bir 1,5 mL'lik RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı.
5. Üzerine 1,5 hacim olacak şekilde (yaklaşık 810 µL) saf etanol eklendi ve birkaç kez pipetaj yapılarak karışımın homojen olması sağlandı.
6. Daha sonra içerik bir Spin Column TR'ye aktarılarak 12.000 x g'de 2 dk santrifüj (Hettich Mikro 200) edildi ve RNA'nın kolona bağlanması sağlandı. Toplayıcı tüpe akan lizat ise atıldı.
7. Ardından Spin Column TR'ye 0,5 ml RPE solüsyonu (RNA Purification Elution) eklenerek kolonun yıkanması sağlandı. Bu işlem ardışık olarak tekrarlandı.
8. Son olarak Spin Column TR 12.000 × g'de 30 saniye boyunca santrifüjlendikten sonra yeni 1,5 mL'lik bir santrifüj tüpüne yerleştirildi, üzerine 30-50 µL RNaz içermeyen su eklendi ve 2 dk bekletildi.
9. Ardından 30 sn boyunca 12.000 x g'de santrifüjlendi ve elüt edilen çözeltilerdeki RNA örneklerinin saflığı NanoDrop spektrofotometresi (AllSheng) kullanılarak (260/280 nm dalga boylarındaki absorbans oranları ölçülerek) değerlendirildi (EK-2).
10. Daha sonra elde edilen RNA örnekleri bir sonraki aşama yapılmaya kadar -80°C'de saklandı.

### 3.5.2. cDNA eldesi

RNA izolasyonundan sonra High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (ThermoFisher Scientific, Cat No: 4368814) kullanılarak cDNA elde edildi. cDNA eldesi için hazırlanan reaksiyon Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.4.** cDNA eldesi için hazırlanan reaksiyon

| Bileşenler                         | Hacim   |
|------------------------------------|---------|
| 10X RT Tamponu                     | 2.0 µL  |
| 25X dNTP Mix (100 mM)              | 0.8 µL  |
| 10X RT Random Primerler            | 2.0 µL  |
| MultiScribe™ Reverse Transkriptaz  | 1.0 µL  |
| Nukleaz içermeyen H <sub>2</sub> O | 4.2 µL  |
| Toplam hacim (her tüp için)        | 10.0 µL |

cDNA sentez reaksiyonu oluşturulduktan sonra tüpler Thermal Cyclor (Bio-Rad T100) cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.5'te belirtilen ısı ve süre koşullarında inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlandı.

**Tablo 3.5.** cDNA sentezi termal döngü koşulları

| Ayarlar  | Adım 1 | Adım 2 | Adım 3 | Adım 4 |
|----------|--------|--------|--------|--------|
| Sıcaklık | 25 °C  | 37 °C  | 85 °C  | 4 °C   |
| Süre     | 10 dk  | 120 dk | 5 dk   | Beklet |

### 3.5.3. Real-Time PCR

PI3K ve Akt1 genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerini saptamak için FastStart Essential DNA Green Master mix (Roche) kiti ve LightCycler96 (Roche) cihazı kullanıldı. Real-Time PCR (RT-PCR) reaksiyonları Tablo 3.6'da belirtilen FastStart Essential DNA Green Master mix (Roche) kitinin önerdiği koşullara uygun olarak hazırlandı. Uygulanan sıcaklık protokolü ise Tablo 3.7'de sunulmuştur.

**Tablo 3.6.** RT-PCR reaksiyon bileşenleri

| Bileşenler          | Hacim        |
|---------------------|--------------|
| Master Mix          | 10 µL        |
| F-primer            | 1 µL         |
| R-primer            | 1 µL         |
| ddH <sub>2</sub> O  | 3 µL         |
| cDNA                | 5 µL         |
| <b>Toplam Hacim</b> | <b>20 µL</b> |

**Tablo 3.7.** RT-PCR’da uygulanan sıcaklık koşulları

| Aşamalar                     | Sıcaklık ve Süre                                                               |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Denatürasyon                 | 95°C de 600 sn                                                                 |
| Amplifikasyon<br>40 döngü    | 95°C de 10 sn.<br>58 °C de 10 sn<br>72 °C de 10 sn                             |
| Erime Eğrisi (Melting Curve) | 95°C de 10 sn.<br>65 °C de 60 sn.<br>97 °C de continue (Acquisitions 3 per/°C) |
| Soğuma                       | 37 °C de 30 sn                                                                 |

Çalışmada Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni, iç kontrol olarak kullanılmak üzere amplifiye edildi. PI3K, Akt ve GAPDH genlerinin amplifikasyonunda kullanılan primer dizileri Tablo 3.8’de verilmiştir. Gen ekspresyon seviyeleri,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  yöntemi ile kantitatif olarak analiz edildi.

**Tablo 3.8.** Primer dizileri

| Gen                            | Primer Dizileri                                                                  |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PI3K</b><br>(GeneID:65052)  | Forward primer: GCTCTCCTCTCATTACACCAAC<br>Reverse primer: GCAGCAAGTACATCAGCAAATC |
| <b>Akt1</b><br>(GeneID:24185)  | Forward primer: CTACAACCAGGACCATGAGAAG<br>Reverse primer: CACACGATGTTGGCAAAGAAG  |
| <b>GAPDH</b><br>(GeneID:24383) | Forward primer: GACCCCTTCATTGACCTCAA<br>Reverse primer: CTCCTGGAAGATGGTGAT       |

### 3.6. Histolojik Analizler

Histolojik değerlendirmeler, Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

#### 3.6.1. Histopatolojik analizler

Sakrifiye edilen hayvanlardan elde edilen böbrek doku örnekleri, %10'luk nötral formaldehit çözeltisinde bir hafta süreyle post-fiksasyona tabi tutuldu. Ardından, ışık mikroskopik analizler için rutin doku takip işlemleri uygulandı (Tablo 3.9). Otomatik doku takip cihazı (Leica TP1020, Nussloch, Germany) kullanılarak gerçekleştirilen rutin histolojik takipte, doku örnekleri alkol, ksilen ve parafin serilerinden geçirildi. Elde edilen parafin bloklardan, Thermo Shandon Finesse ME mikrotom cihazı (Thermo Fisher Scientific, Cheshire, UK) ile 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı ve hazırlanan kesitler, Hematoksilen&Eozin ve Masson Trikom boyama yöntemleriyle boyandı. Ardından slaytlar ışık mikroskopunda (Leica DFC295) semikantitatif olarak değerlendirildi ve fotoğraflandı. Semikantitatif skorlamada; 0: hasar yok, 1: %10'dan az hasar, 2: %10-25 hasar, 3: %25-50 hasar, 4: %50-75 hasar, 5: %75'ten fazla hasar olarak derecelendirildi (Zhang vd., 2021).

**Tablo 3.9.** Doku takip serileri

| Sıra | İşlem               | Süre  |
|------|---------------------|-------|
| 1    | %70 Etil Alkol      | 2 h   |
| 2    | %80 Etil Alkol      | 2 h   |
| 3    | %96 Etil Alkol I    | 1 h   |
| 4    | %96 Etil Alkol II   | 1 h   |
| 5    | %100 Etil Alkol I   | 1 h   |
| 6    | %100 Etil Alkol II  | 1 h   |
| 7    | Etil Alkol + Ksilol | 15 dk |
| 8    | Ksilol I            | 45 dk |
| 9    | Ksilol II           | 45 dk |
| 10   | Parafin             | 1 h   |
| 11   | Parafin             | 1 h   |
| 12   | Gömme               |       |

### 3.6.2. İmmunohistokimyasal analizler

Parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında alınan kesitler, polilizinli lamlara yerleştirildikten sonra deparafinize edildi. Ardından, kesitler dereceli alkol serilerinden geçirildi ve sitrat tampon solüsyonunda (pH: 6) mikrodalga fırında (750W) 12 dk boyunca antijen geri kazanımı (antigen retrieval) için kaynatıldı. Kaynatma işleminin ardından, oda sıcaklığında soğutulan dokular Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkandı ve endojen peroksidaz aktivitesini engellemek amacıyla 6 dk boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu uygulandı.

PBS ile üç kez 5'er dk yıkanan dokulara, 5 dk bloklama solüsyonu uygulandı ve sonrasında 1/200 oranında sulandırılan primer antikorlar [AKT-1 antibody Mouse IgG (AHO1112, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) ve PIK-3 antibody rabbit monoclonal IgG (MA5-32747, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)] ile 60 dk boyunca nemli ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonunun ardından, dokular PBS ile 3 kez 5'er dk yıkandı ve ardından primer antikor ile uyumlu sekonder antikor ile 30 dk nemli ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikor uygulamasından sonra dokular tekrar PBS ile 3 kez 5'er dk yıkandı, ardından Streptavidin Peroksidaz (TS-125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dk nemli ortamda, oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında dokular PBS içerisine alındı.

Doku kesitlerine 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen solüsyonu damlatılarak ışık mikroskopunda sinyal elde edildi. Tüm gruplar eş zamanlı olarak PBS ile yıkandı, ardından Mayer's hematoksilin ile karşı boyama yapıldı. Kesitler PBS ve distile sudan geçirilerek, uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelendi ve fotoğraflandı (Leica DFC295).

Boyama sonrası immünreaktivitenin yaygınlığı [0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100] ve şiddeti [0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli] esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor, yaygınlık ve şiddetin çarpımı ile hesaplandı (Histoskor = yaygınlık x şiddet) (Türk vd., 2023).

### 3.7. İstatistiksel Analiz

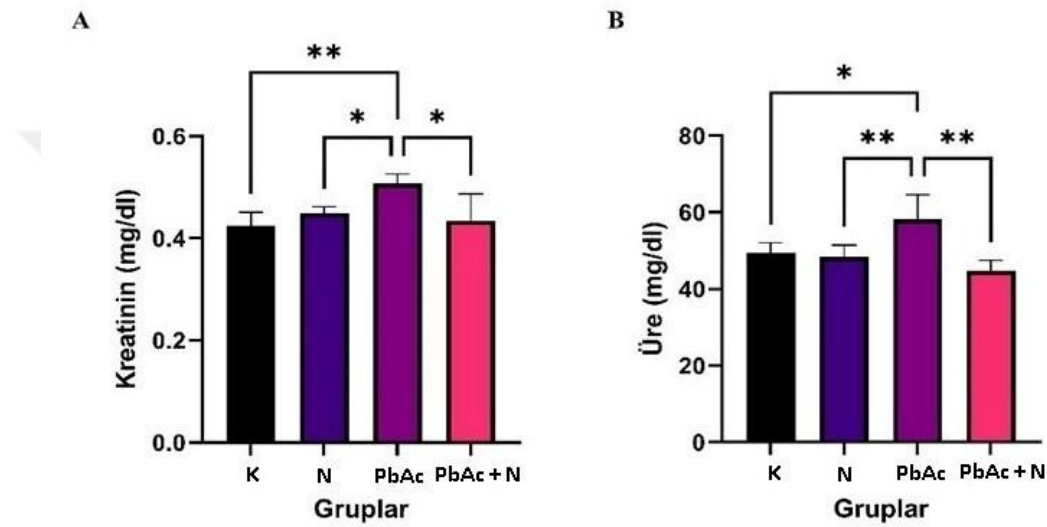
İstatistiksel analizler, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 25.0 (Chicago, IL, ABD) ve GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, ABD)

programları kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler, ortalama  $\pm$  standart sapma (SS) olarak sunuldu. Element, enzimatik ve non-enzimatik aktivite analizlerinde gruplar arası karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve ardından Tukey post-hoc testi uygulandı. Biyokimyasal ve gen ekspresyonu analizlerinde ise tek yönlü ANOVA sonrası LSD testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edildi. Histolojik analizlerde sayısal veriler medyan (minimum-maksimum) olarak özetlendi. İki den fazla grup arasındaki karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki karşılaştırmalarda ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm histolojik testlerde Bonferroni düzeltmesi uygulanarak istatistiksel anlamlılık düzeyi 0,01 olarak kabul edildi. Bağımlı değişkenlerin analizinde ise paired samples t-testi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Analiz Bulguları

Çalışmamızda PbAc grubunda serum kreatinin ve üre seviyeleri K ve N gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Sırasıyla  $p < 0,01$  ve  $p < 0,05$ ). Buna karşılık PbAc + N grubunda, N'nin etkisi ile kreatinin ( $p < 0,05$ ) ve üre ( $p < 0,01$ ) düzeylerinde PbAc grubun göre anlamlı bir azalma gözlemlendi (Şekil 4.1; Tablo 4.1).



**Şekil 4.1.** PbAc ve N'nin böbrek fonksiyonu üzerine olan etkisi

(A: Kreatinin, B: Üre. K: Kontrol; N: Naringin; PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .)

**Tablo 4.1.** Çalışma grubuna ait kreatinin ve üre düzeyleri

| Gruplar           | K                            | N                            | PbAc                             | PbAc + N                     | p değeri |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------|
| Kreatinin (mg/dL) | 0,4250±0,02588 <sup>c</sup>  | 0,4500±0,01155 <sup>c</sup>  | 0,5080±0,01789 <sup>a,b,d</sup>  | 0,4350±0,05196 <sup>c</sup>  | 0,002    |
| Üre (mg/dL)       | 49,4000±2,70185 <sup>c</sup> | 48,4000±3,04959 <sup>c</sup> | 58,2000±6,41872 <sup>a,b,d</sup> | 44,7500±2,75379 <sup>c</sup> | 0,001    |

Her grup ortalama  $\pm$  SS'yı ifade eder. a: K'dan istatistiksel olarak farklı; b: N'den istatistiksel olarak farklı; c: PbAc'den istatistiksel olarak farklı; d: PbAc + N'den istatistiksel olarak farklı. K: Kontrol, N: Naringin, PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin.

### 4.2. Element Analiz Bulguları

Böbrek dokusunda eser element ve mineral seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.2);

- Cu seviyesi:** PbAc grubunda K grubuna göre anlamlı azalma ( $p < 0,001$ ) ve PbAc + N grubunda PbAc grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir artış ( $p = 0,146$ ) gözlemlendi.

- **Fe seviyesi:** PbAc grubunda K grubuna göre anlamlı olmayan azalma ( $p = 0,840$ ) ve PbAc + N grubunda PbAc grubuna kıyasla anlamlı olmayan artış ( $p = 0,983$ ) saptandı.
- **Zn seviyesi:** PbAc grubunda K grubuna göre nispi bir azalma ( $p = 0,162$ ), PbAc + N grubunda ise Zn seviyesinin PbAc grubuna göre nispeten arttığı belirlendi ( $p = 0,933$ ).
- **Mangan (Mn) seviyesi:** PbAc grubunda K grubuna kıyasla anlamlı bir artış tespit edilirken ( $p < 0,001$ ), PbAc + N grubunda Mn seviyesinin PbAc grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ( $p = 0,002$ ).
- **Pb seviyesi:** K grubu ile karşılaştırıldığında N grubu hariç diğer gruplar arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi ( $p < 0,001$ ) ve PbAc + N grubunda Pb seviyesinin PbAc grubuna göre önemli ölçüde azaldığı belirlendi ( $p < 0,001$ ).
- **Magnezyum (Mg) seviyesi:** Tüm gruplar arasında anlamlı bir değişim göstermemekle birlikte ( $p > 0,05$ ), K grubu ile karşılaştırıldığında PbAc grubunda Mg seviyesinin nispeten arttığı ( $p > 0,05$ ), PbAc + N grubunda ise PbAc grubuna göre nispeten azaldığı gözlemlendi ( $p > 0,05$ ).
- **Ca seviyesi:** PbAc grubunda K grubuna göre azalma ( $p < 0,001$ ) gözlenmiş, PbAc + N grubunda Ca seviyesinin PbAc grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ( $p = 0,021$ ).

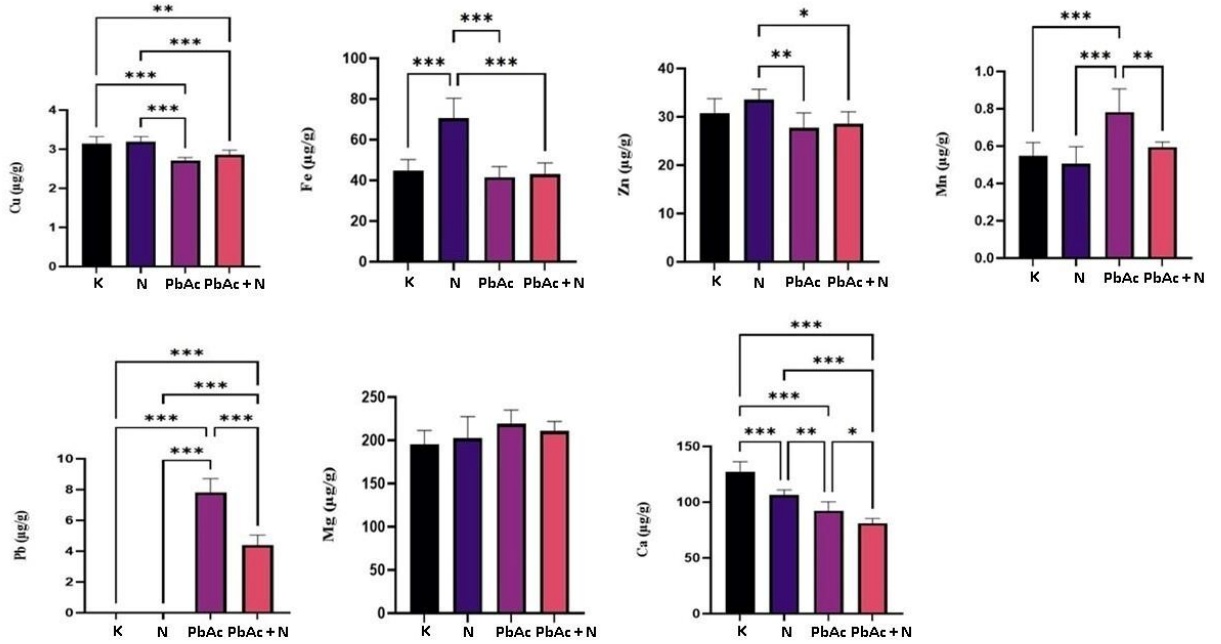
#### 4.3. Enzimatik ve Non-Enzimatik Aktivite Bulguları

Böbrek AChE aktivitesine ilişkin olarak, PbAc grubunda AChE aktivitesi K grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). Benzer şekilde, PbAc + N grubunun AChE aktivitesi de K ve N gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0,001$ ). Bununla birlikte, PbAc + N grubunun AChE aktivitesinde PbAc grubuna kıyasla anlamlı derecede bir düşüş olduğu gözlemlendi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.3A).

Böbrek CaE aktivitesi incelendiğinde; PbAc grubunda CaE aktivitesinin diğer gruplara göre anlamlı düzeyde azaldığı saptandı ( $p < 0,001$ ). Ayrıca, PbAc + N grubunda CaE aktivitesinin PbAc grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.3B).

Böbrek GST aktivitesi açısından değerlendirme yapıldığında, PbAc grubunda GST aktivitesinin K, N ve PbAc + N gruplarına göre anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ( $p <$

0,001). Ayrıca PbAc + N grubunda GST aktivitesinin PbAc grubuna göre de azaldığı saptandı ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.3C).

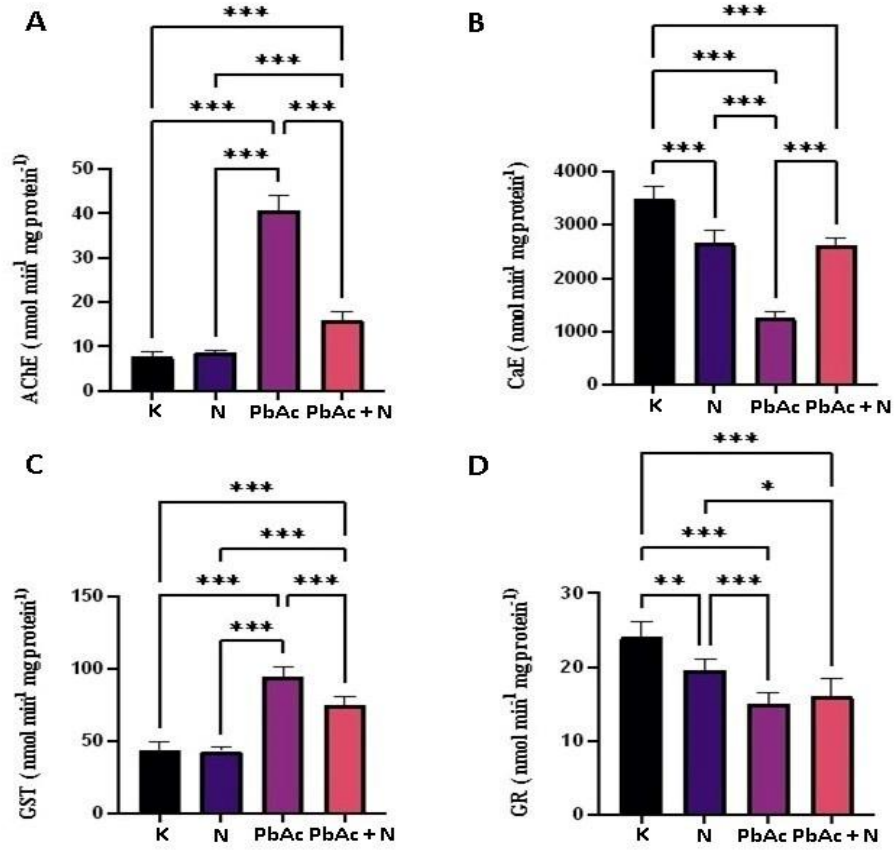


**Şekil 4.2. Böbrek dokusuna ait metal düzeyleri**

(K: Kontrol; N: Naringin; PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin; Cu: Bakır; Fe: Demir; Zn: Çinko; Mn: Mangan; Pb: Kurşun; Mg: Magnezyum; Ca: Kalsiyum. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ )

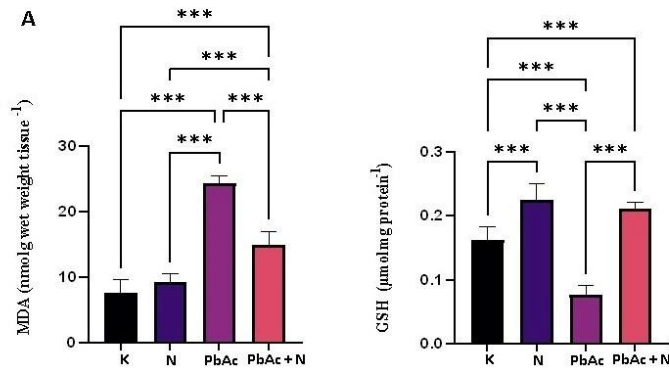
Son olarak, böbrek GR aktivitesi PbAc grubunda, K ve N gruplarına göre anlamlı düzeyde azalma gösterdi ( $p < 0,001$ ). Ancak, PbAc + N grubunda GR aktivitesi açısından PbAc grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ) (Şeki 4.3D).

Böbrek MDA seviyesi incelendiğinde PbAc grubunda diğer gruplara göre MDA düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiş ( $p < 0,001$ ), buna karşılık PbAc + N grubunda MDA seviyenin belirgin şekilde azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.4A). Böbrek GSH seviyeleri değerlendirildiğinde ise, N grubunda GSH düzeylerinin K ve PbAc gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi ( $p < 0,001$ ). Ayrıca, PbAc + N grubunda GSH seviyesinin PbAc grubuna göre anlamlı şekilde arttığı saptandı ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.4B).



**Şekil 4.3.** Böbrek dokusundaki enzim aktivite düzeyleri (A) AChE, (B) CaE, (C) GST, (D) GR.

(K: Kontrol; N: Naringin; PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin; AChE: Asetilkolinesteraz; CaE: Karboksilesteraz; GST: Glutasyon-S-Transferaz; GR: Glutasyon Redüktaz. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).



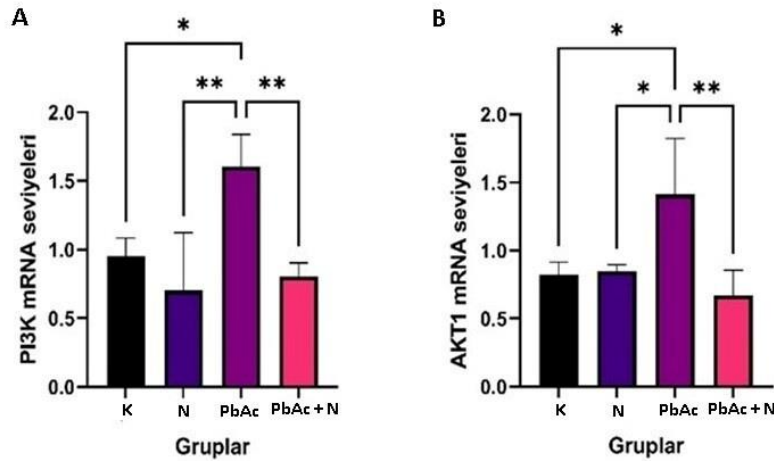
**Şekil 4.4.** Böbrek MDA ve GSH seviyeleri (A) MDA seviyesi (B) GSH seviyesi (K: Kontrol; N: Naringin; PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin; MDA: Malondialdehit; GSH: Glutasyon. \*\*\* $p < 0,001$ )

#### 4.4. Gen Ekspresyonu Bulguları

Çalışmada PI3K gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, PbAc grubunda K ve N gruplarına göre anlamlı bir artış gözlenirken (sırasıyla  $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$ ), PbAc + N grubunda ise PbAc grubuna göre anlamlı bir şekilde azalma görüldü ( $p < 0.01$ ) (Şekil 4.5A; Tablo 4.2).

Akt1 gen ekspresyon düzeyleri ise K ve N gruplarında benzer bulunurken, PbAc grubunda Akt1 gen ekspresyonu düzeyinde anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). PbAc + N grubunda ise Akt1 gen ekspresyon seviyesi, PbAc grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşük olmakla birlikte ( $p < 0,01$ ), K ve normal gruplar ile aynı düzeylerde seyretti ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.5B; Tablo 4.2).

Bu bulgular, PbAc grubunda hem PI3K hem de Akt1 gen ekspresyonunun arttığını, PbAc + N grubunda ise bu artışın kısmen azaldığını gösterdi.



**Şekil 4.5.** Çalışma grubuna ait PI3K ve Akt1 gen ekspresyon seviyeleri

(A) PI3K (B) Akt1

Akt1: Akt serin/ treonin kinaz 1; PI3K: Fosfatidil inositol-3 kinaz; K: Kontrol, N: Naringin, PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

**Tablo 4.2.** Çalışma grubuna ait PI3K ve Akt gen ekspresyon düzeyleri

| Gruplar | K                           | N                           | PbAc                            | PbAc + N                    | p değeri |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------|
| PI3K    | 0,9525±0,13200 <sup>c</sup> | 0,7025±0,42106 <sup>c</sup> | 1,6033±0,23502 <sup>a,b,d</sup> | 0,8050±0,9883 <sup>c</sup>  | 0,004    |
| Akt1    | 0,8220±0,09445 <sup>c</sup> | 0,8500±0,04583 <sup>c</sup> | 1,4120±0,41167 <sup>a,b,d</sup> | 0,6725±0,18392 <sup>c</sup> | 0,003    |

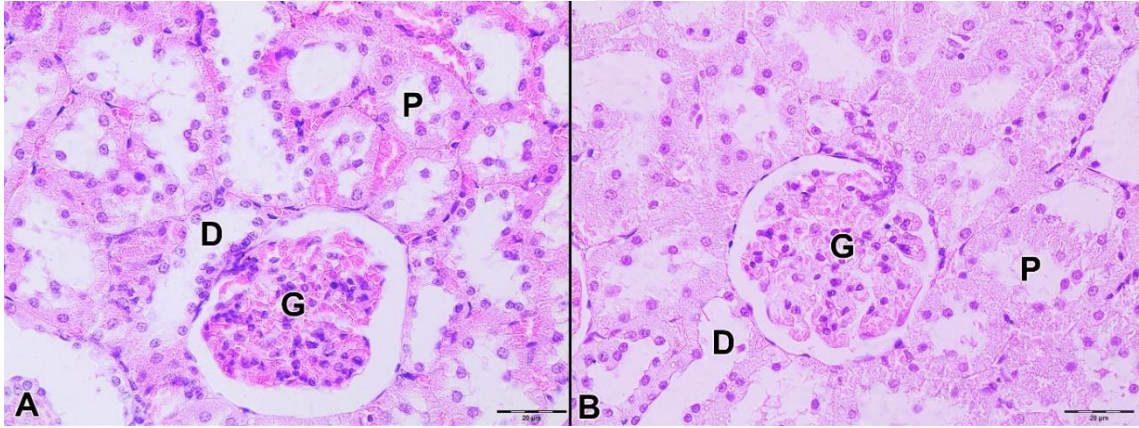
Her grup ortalama ± SS'yı ifade eder. a: K'dan istatistiksel olarak farklı; b: N'den istatistiksel olarak farklı; c: PbAc'den istatistiksel olarak farklı; d: PbAc + N'den istatistiksel olarak farklı. K: Kontrol, N: Naringin, PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin.

#### 4.5. Histolojik Analiz Sonuçları

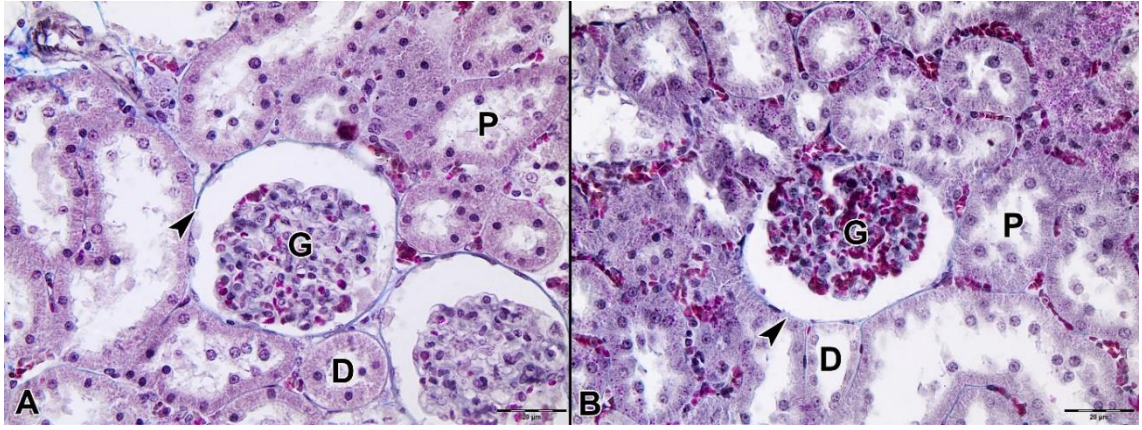
##### 4.5.1. Histopatolojik bulgular

Hematoksilen & Eozin ve Masson Trikrom ile boyanan doku kesitlerinin ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucunda tüm gruplardaki böbrek dokuları, ödem, konjesyon, tübüler dejenerasyon, hücresel infiltrasyon, glomerüler dejenerasyon, tübüler hücre dökülmesi ve bağ dokusu artışı açısından değerlendirildi ve her bir hayvan için histopatolojik bulgular semikantitatif olarak skorlandı.

K ve N gruplarındaki sıçan böbrek dokularında, böbrek glomerülleri ile kortikal ve medüller bölgede yer alan tübüller ve peritübüler alanların normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi ve bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ( $p > 0,05$ ) (Şekil 4.6A-B, Şekil 4.7A-B).

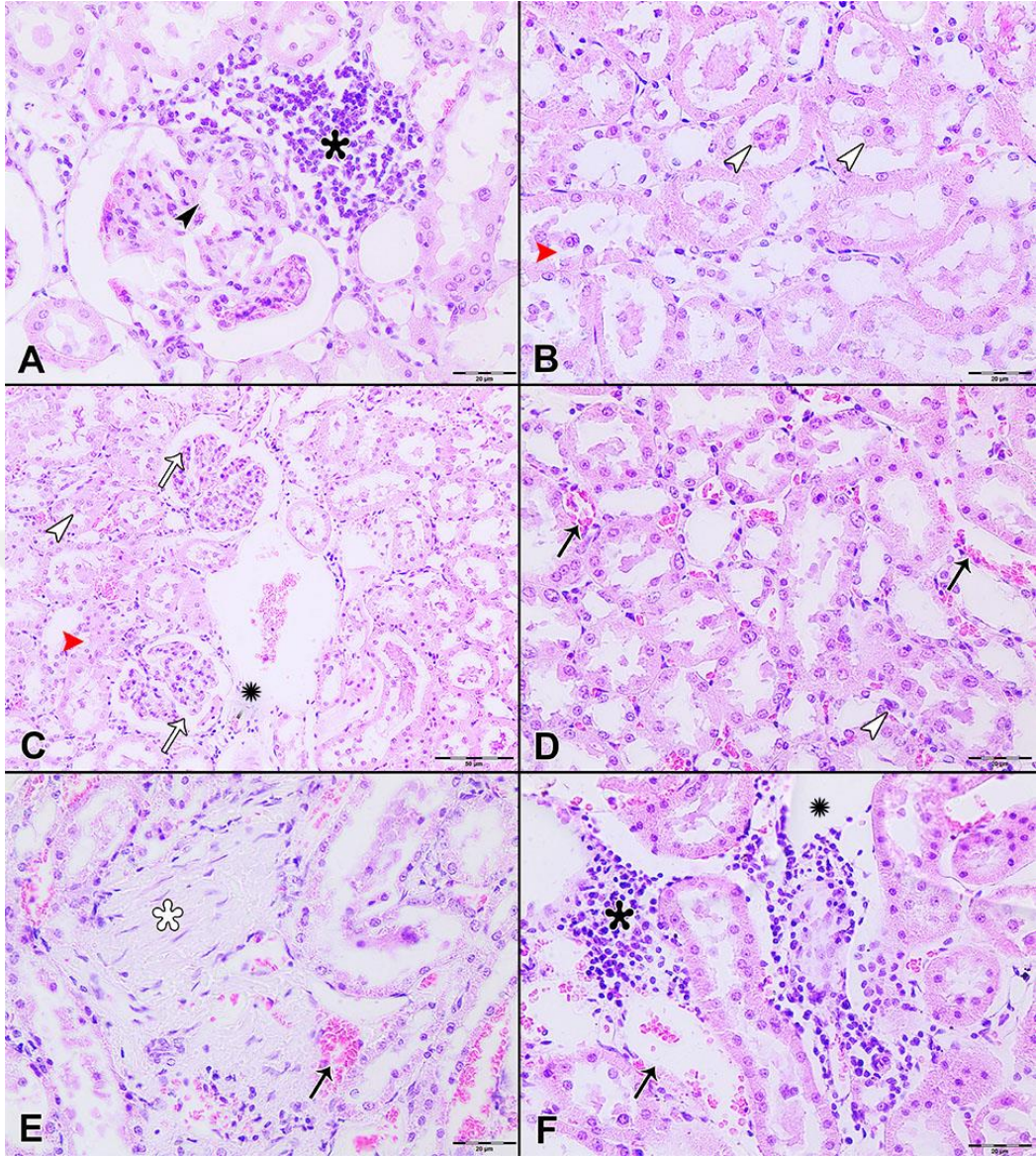


**Şekil 4.6.** *H & E ile boyanan K (A) ve N gruplarına (B) ait böbrek dokularının histolojik görüntüsü (G: Glomerül; D: Distal tübül; P: Proksimal tübül. Scala bar: 20µm, H & E boyama, X400)*

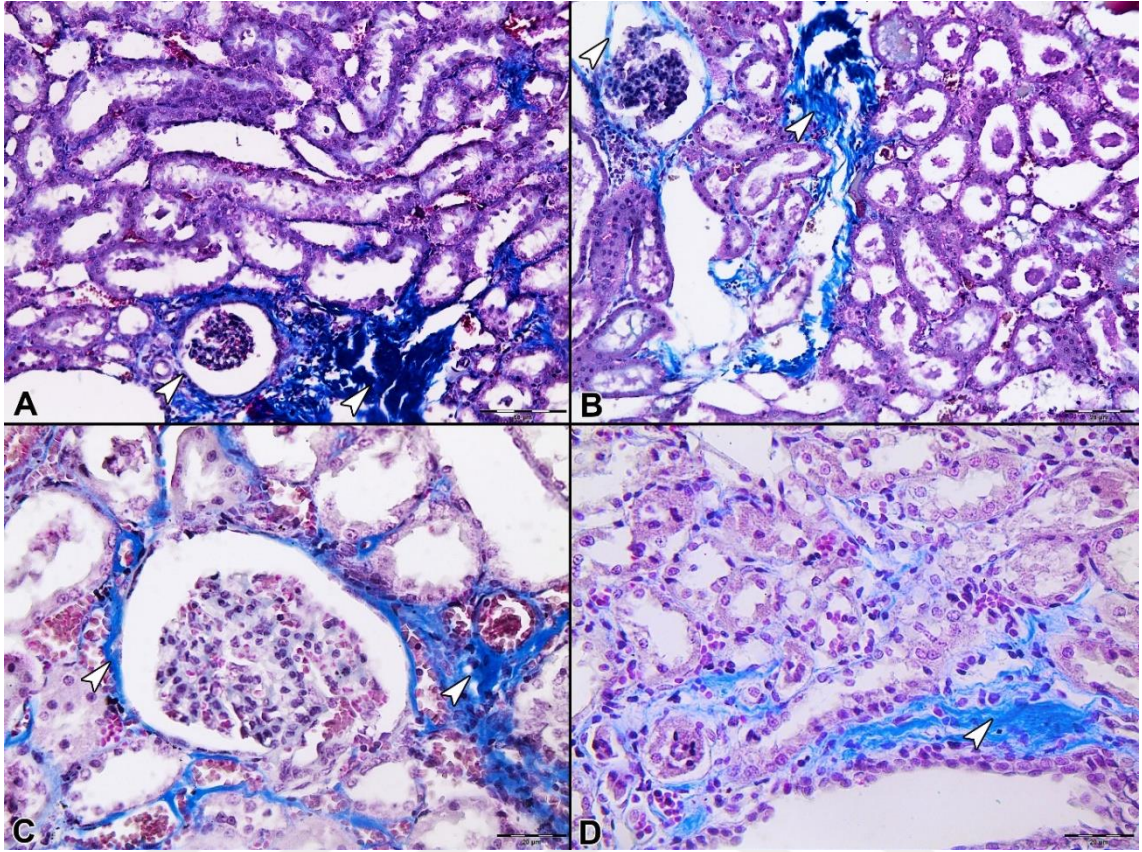


**Şekil 4.7.** *Masson Trikom ile boyanan K (A) ve N gruplarına (B) ait böbrek dokularının histolojik görüntüsü (G: Glomerül; D: Distal tübül; P: Proksimal tübül. Scala bar: 20μm, Masson Trikom boyama, X400)*

PbAc grubunda K grubu ile kıyaslama yapıldığında, belirgin ödem ve konjesyonun yanı sıra anlamlı düzeyde tübüler dejenerasyon tespit edildi ( $p < 0,001$ ). Ayrıca, bu grupta K grubuna kıyasla hücresel infiltrasyon, glomerüller dejenerasyon ve tübüler hücre dökülmesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlendi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.8). Masson Trikom boyama ile yapılan değerlendirmede ise, PbAc grubunda bağ dokusu artışının K grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptandı ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.9).



**Şekil 4.8.** *H & E ile boyanan PbAc grubuna ait sıçan böbrek dokularının histolojik görüntüsü (Siyah ok: Konjesyon, Siyah güneş: Ödem, Beyaz yıldız: Bağ doku artışı, Siyah yıldız: İnfiltrasyon alanı, Kırmızı ok: Tübüler dejenerasyon, Beyaz ok başı: Lümene dökülmüş epitelyal hücreler, Beyaz ok: Glomerüler lobulasyon, Siyah ok başı: Glomerüler kapillerlerde dejenerasyon. Scala bar: 20µm, A, B, D, E ve F X400, C X200. H & E boyama)*



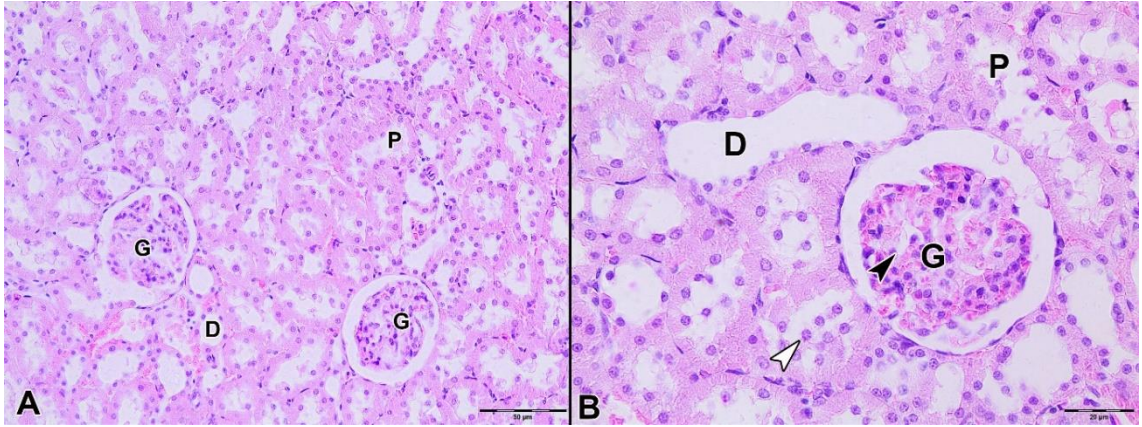
**Şekil 4.9.** Masson Trikom ile boyanan PbAc grubuna ait sıçan böbrek dokularının histolojik görüntüsü (Beyaz ok başı: Renal korpuskül parietal yaprağında ve interstisyel alanda artmış bağ dokusu lifleri, Scala bar: 20µm, A ve B X200, C ve D X400 Masson Trikom boyama)

PbAc + N grubunda PbAc grubuna göre, böbrek dokusunda ödem ve konjesyonun anlamlı şekilde azaldığı ( $p < 0,001$ ), tübüler dejenerasyonun hafiflediği ( $p < 0,001$ ) ve ayrıca infiltrasyon, glomerüler dejenerasyon, tübüler hücre dökülmesi ile bağ dokusu artışının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ( $p < 0,001$ ) ve K grubuna benzer histolojik özellikler gösterdiği tespit edildi (Tablo 4.3) (Şekil 4.10, Şekil 4.11).

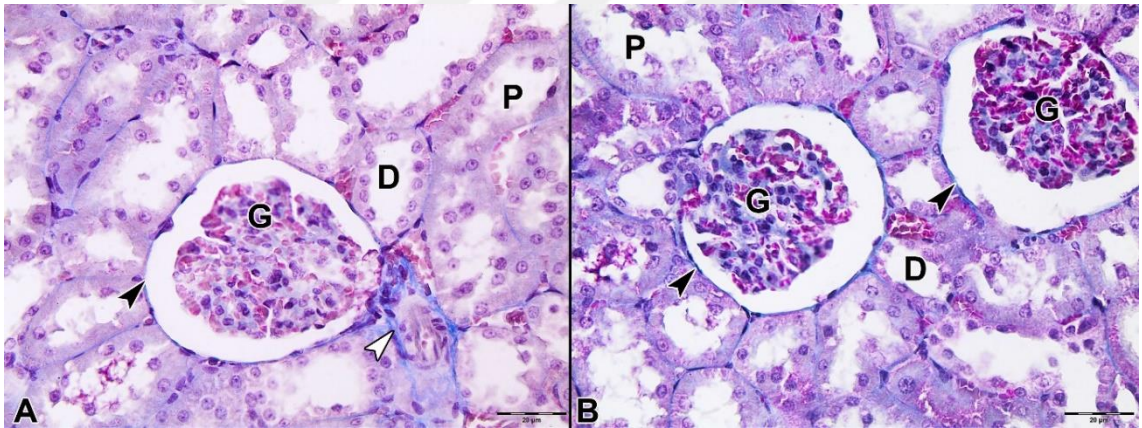
**Tablo 4.3.** Sıçan böbrek dokularının semikantitatif histopatolojik skorlama sonuçları

| Gruplar  | Ödem<br>Median<br>(min-maks)     | Konjesyon<br>Median<br>(min-maks) | Tübüler<br>dejenerasyon<br>Median<br>(min-maks) | İnfiltrasyon<br>Median<br>(min-maks) | Glomerül<br>dejenerasyon<br>Median<br>(min-maks) | Tübüler hücre<br>dökülmesi<br>Median<br>(min-maks) | Bağ dokusu<br>artışı<br>Median<br>(min-maks) |
|----------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| K        | 0,00<br>(0,00-1,00)              | 0,00<br>(0,00-0,00)               | 0,00<br>(0,00-0,00)                             | 0,00<br>(0,00-1,00)                  | 0,00<br>(0,00-1,00)                              | 0,00<br>(0,00-0,00)                                | 0,00<br>(0,00-0,00)                          |
| N        | 0,00<br>(0,00-1,00)              | 0,00<br>(0,00-0,00)               | 0,00<br>(0,00-0,00)                             | 0,00<br>(0,00-0,00)                  | 0,00<br>(0,00-0,00)                              | 0,00<br>(0,00-0,00)                                | 0,00<br>(0,00-1,00)                          |
| PbAc     | 3,00<br>(3,00-4,00) <sup>a</sup> | 2,00<br>(2,00-4,00) <sup>a</sup>  | 3,00<br>(1,00-5,00) <sup>a</sup>                | 3,00<br>(2,00-5,00) <sup>a</sup>     | 4,00<br>(2,00-5,00) <sup>a</sup>                 | 3,00<br>(2,00-3,00) <sup>a</sup>                   | 3,00<br>(3,00-4,00) <sup>a</sup>             |
| PbAc + N | 0,00<br>(0,00-1,00) <sup>b</sup> | 0,00<br>(0,00-1,00) <sup>b</sup>  | 0,00<br>(0,00-0,00) <sup>b</sup>                | 0,00<br>(0,00-1,00) <sup>b</sup>     | 1,00<br>(0,00-1,00) <sup>b</sup>                 | 1,00<br>(0,00-0,00) <sup>b</sup>                   | 1,00<br>(0,00-0,00) <sup>b</sup>             |

Değerler median (min-maks) olarak verilmiştir. <sup>a</sup> K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark, <sup>b</sup> PbAc grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı (p < 0,01). K: Kontrol, N: Naringin, PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin.



**Şekil 4.10.** H & E ile boyanan PbAc + N grubuna ait sıçan böbrek dokularının histolojik görüntüsü (A) K grubuyla benzer histolojik morfolojiye sahip glomerüller, proksimal ve distal tübüller görülmektedir (B) Tübül lümenlerinde dökülmüş epitelial hücreler (beyaz ok başı) ve glomerüler kapillerlerde dilatasyonun (siyah ok başı) azaldığı görülmektedir. (G: Glomerül; D: Distal tübül; P: Proksimal tübül. Scala bar: 20µm AX200 ve B X400. H & E boyama).

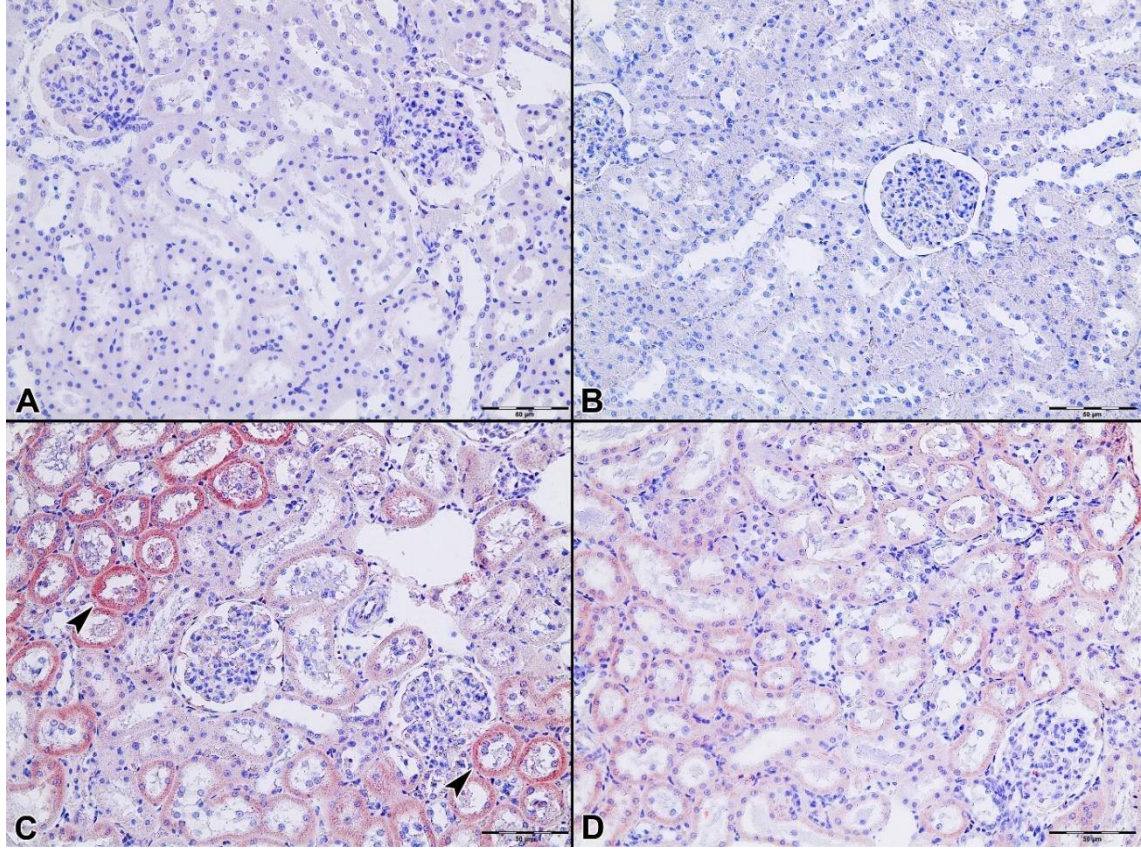


**Şekil 4.11.** Masson Trikom ile boyanan PbAc + N grubuna ait sıçan böbrek dokularının histolojik görüntüsü [Normal morfolojiye sahip glomerüller (G), proksimal (P) ve distal (D) tübüller ile renal korpüskül parietal yaprağı (siyah ok başı), PbAc grubuna göre interstisyel alanda bağ dokusu liflerinde azalma (beyaz ok başı), (G: Glomerül; D: Distal tübül; P: Proksimal tübül. Scala bar: 20µm, A ve B X400, Masson Trikom boyama]

#### 4.5.2. İmmünohistokimyasal bulgular

İmmünohistokimyasal boyama ile yapılan değerlendirmede, Akt1 immünreaktivitesinin K ve N gruplarında benzer düzeyde olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı gözlemlendi ( $p > 0,05$ ). PbAc grubunda ise, K grubuna kıyasla Akt1 immünreaktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p < 0,001$ ).

Ayrıca PbAc + N grubunda Akt1 immünreaktivitesi, PbAc grubuna göre anlamlı derecede azalmış olarak saptandı ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.12, Tablo 4.4).



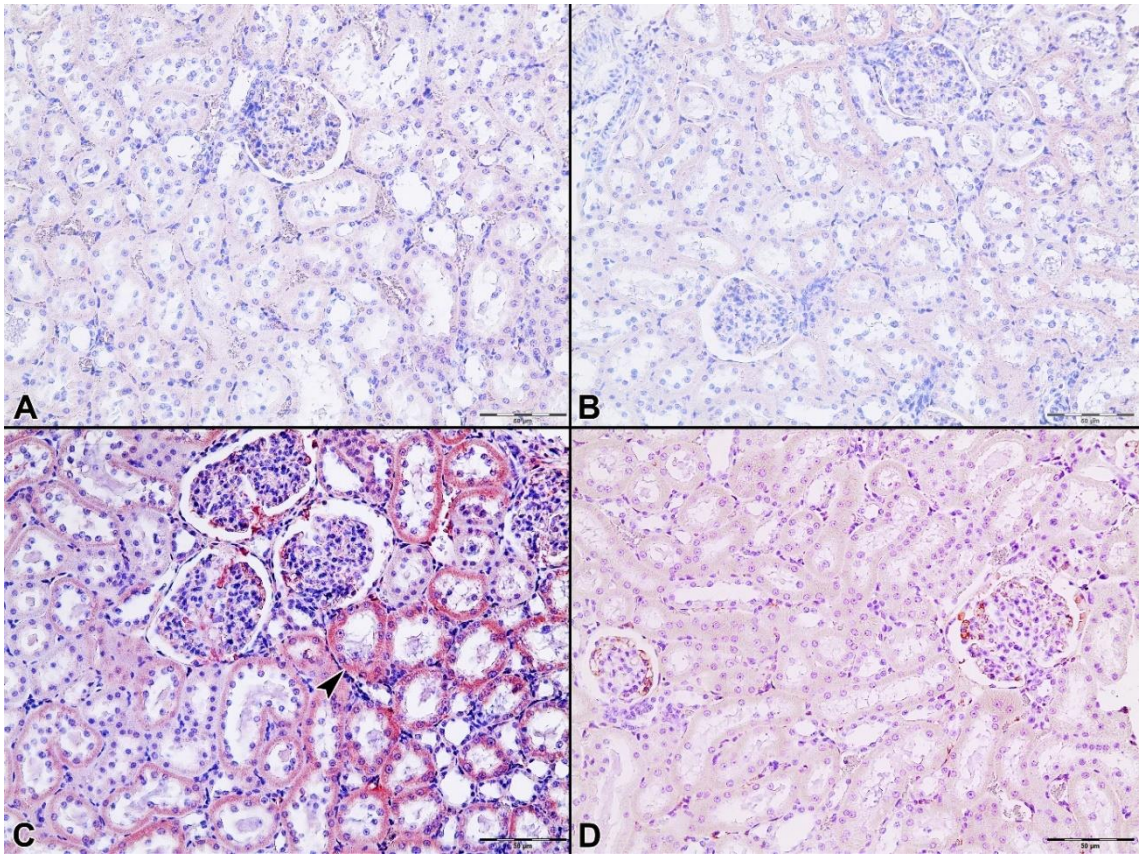
**Şekil 4.12.** Böbrek dokusundaki Akt1 immünreaktivitesi (siyah ok başı) (A) K grubu, (B) N grubu, (C) PbAc grubu, (D) PbAc + N grubu. İmmünohistokimyasal boyama, AEC kromojen, Mayers Hematoksilen, Scala bar: 50  $\mu$ m, X200 büyütme. K: Kontrol, N: Naringin, PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin.

**Tablo 4.4.** Böbrek dokusunda Akt1 immünoreaktivitesine ait histoskorlama

| Gruplar  | Akt1 histoskoru                |
|----------|--------------------------------|
|          | Median (min-maks)              |
| K        | 0, 30(0, 10-0,40)              |
| N        | 0, 20(0, 10-, 0,60)            |
| PbAc     | 1,20(0,90-2,70) <sup>a</sup>   |
| PbAc + N | 0, 80(0, 60-1,20) <sup>b</sup> |

Değerler ortalama  $\pm$  Median (min-maks) olarak verilmiştir.<sup>a</sup> K grubuna göre karşılaştırıldığında anlamlı, <sup>b</sup> PbAc grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı,  $p < 0.001$ . K: Kontrol, N: Naringin, PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin.

PI3K immünreaktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucunda, K ve N gruplarında benzer düzeyde PI3K immünreaktivitesi gözlemlendi ( $p > 0,05$ ). PbAc grubunda ise, K grubuna kıyasla PI3K immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ( $p < 0,001$ ). Ayrıca, PbAc + N grubu ile PbAc grubu karşılaştırıldığında, PbAc + N grubunda PI3K immünreaktivitesinin anlamlı şekilde azaldığı belirlendi ( $p < 0,001$ ) (Şekil 4.13, Tablo 4.5).



**Şekil 4.13.** Böbrek dokusundaki PI3K immünreaktivitesi (siyah ok başı) (A) K grubu, (B) N grubu, (C) PbAc grubu, (D) PbAc + N grubu. İmmünohistokimyasal boyama, İmmünohistokimyasal boyama, AEC kromojen, Mayers Hematoksilen, Scala bar: 50  $\mu$ m, X200 büyütme. K: Kontrol, N: Naringin, PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin.

**Tablo 4.5.** Böbrek dokusunda PI3K immünoaktivitesine ait histoskorlama

| Gruplar  | PI3K histoskoru                 |
|----------|---------------------------------|
|          | Median (min-maks)               |
| K        | 0, 10(0, 10-0,40)               |
| N        | 0, 20(0, 00-, 0,30)             |
| PbAc     | 1,80(1,20-2,70) <sup>a</sup>    |
| PbAc + N | 0, 40(0, 20-0, 80) <sup>b</sup> |

Değerler ortalama  $\pm$  Median (min-maks) olarak verilmiştir.<sup>a</sup> K grubuna göre karşılaştırıldığında anlamlı, <sup>b</sup> PbAc grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı,  $p < 0.001$ . K: Kontrol, N: Naringin, PbAc: Kurşun asetat; PbAc + N: Kurşun asetat + Naringin.

## 5. TARTIŞMA

Pb, böbrek yapısı ve fonksiyonunda önemli değişikliklere neden olabilen ve nefrotoksisiteye yol açabilen ağır bir metaldir (Saleh vd., 2025). Pb, ROS seviyelerini artırarak ve antioksidan savunma mekanizmalarını bozarak OS'ye neden olur (Caetano vd., 2023). OS, ROS oluşumu ile bunların antioksidan savunma enzimleri (SOD, CAT, GPx) aracılığıyla detoksifikasyonu arasındaki dengenin bozulması sonucu, ROS'un aşırı seviyelerde birikmesiyle karakterize edilen bir durumdur (Cecerska-Heryć vd., 2024). Pb'nin OS aracılığı ile nefrotoksisite, hepatotoksisite, ensefalopati ve hatta ölüme neden olabileceği gösterilmiştir (Tian vd., 2025). Bu nedenle mevcut çalışmamızda PbAc'nin böbrek üzerindeki toksisitesi ve buna karşı N'nin koruyucu etkisini ele aldık.

Mevcut çalışmada PbAc grubunda böbrek fonksiyonunun güvenilir göstergeleri olarak hizmet eden üre (BUN) ve kreatinin (CREA) düzeylerinin arttığını tespit ettik. Yapılan çalışmalarda BUN ve CREA kronik böbrek hastalığının erken teşhisi için işlevsel biyobelirteçler olarak bildirilmiştir (Dagher & Zaghloul 2025; Tolou-Ghamari 2025). Artan kanıtlar BUN ve CREA seviyelerinin artmasının hem akut hem de kronik böbrek hasarının tipik bir özelliği olarak böbrek sisteminin atık ürünleri yeterince filtreleyememesinden kaynaklandığını göstermektedir (Ai-Rufaei vd., 2025; Tyagi & Aeddula 2025). Bununla birlikte, Pb ile birlikte uygulanan N, Pb maruziyetine bağlı olarak serum BUN ve CREA düzeylerindeki artışı engellemiş; membran stabilitesini ve bütünlüğünü koruyarak, bu azotlu biyobelirteçlerin dolaşıma sızmasını önlemek suretiyle renoprotektif etkisini göstermiştir. Bulgularımız Pb kaynaklı hasarın azaltılmasında bir antioksidan olan sarımsağın silimarin ile kombinasyonunun etkili olduğunu ileri süren çalışmanın bulguları ile uyumludur (El-Khishin vd., 2015). Ayrıca başka bir çalışmada krisin'in PbAc kaynaklı böbrek hasarını hafifleterek BUN ve CREA düzeylerini düşürdüğü tespit edilmiştir (Kucukler vd., 2021). Mevcut çalışmada böbrek hasarı biyobelirteçlerine ek olarak, metabolizma, detoksifikasyon ve OS ile ilgili biyobelirteçler olan CaE, GR, GSH, AChE, GST ve MDA gibi enzim aktivitelerinin düzeyleri ölçülerek Pb'nin böbrek üzerindeki etkisi tahmin edilmeye çalışılmıştır. Ağır metallerin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri büyük ölçüde, antioksidan savunma mekanizmalarını engelleme kapasiteleriyle bağlantılıdır. Bu etki, öncelikle SOD, CAT, GPx, GR ve diğer enzim sistemleri gibi antioksidan enzimlerin hücre içi GSH veya sülfhidril grupları (R-SH) ile etkileşimleri yoluyla gerçekleşir (Jomova vd., 2025). CaE, birçok aktif farmasötik

bileşenlerin, ön ilaçların ve farmasötik yardımcı maddeleri hidrolize edebilen faz I enzimi olup detoksifikasyonda rol oynar (Vinarov vd., 2025; Yao vd., 2025). GR, oksitlenmiş glutasyonu GSH'a indirgeyerek hücrel redoks durumunu korur ve bu da antioksidan savunmayı düzenler (Zhang vd., 2025a). GSH, redoks dengesinin korunmasında, OS'nin azaltılmasında ve hücrel homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar (Xue vd., 2025). AChE, sinaptik aralıkta asetilkolini hidrolize ederek nörotransmisyonunda rol oynayan kritik bir enzimdir ve bu da onu özellikle AD gibi nörodejeneratif bozuklukların tedavisinde ilaç keşfi için önemli bir hedef haline getirir (Reynoso-García vd., 2025). AChE, beyin bozuklukları, nörotransmisyon değişiklikleri ve kanser dahil olmak üzere çeşitli nörolojik hastalıklarda hayati bir rol oynar (Gui vd., 2025). GST, hücrel detoksifikasyonda önemli bir enzimdir ve GSH'nin toksik elektrofilik substratlarla nükleofilik saldırısını katalize ederek daha az zararlı bileşikler üreterek hücrel detoksifikasyona yardımcı olur (Lu vd., 2025). MDA, hücrelerdeki lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir ve önemli proteinlerin yapı ve işlevlerini değiştirmesi sonucu çok sayıda patolojik duruma yol açan doku hasarının önemli bir biyobelirteci olduğu bilinmektedir (Thakkar vd., 2025; Zheng vd., 2025).

Mevcut çalışmada Pb grubundaki böbrek dokularında CaE, GR, GSH seviyelerinde eş zamanlı bir azalmanın yanı sıra, önemli ölçüde yükselmiş AChE, GST, MDA düzeyleri tespit ettik. Pb kaynaklı ROS üretilmesi sonucu vücutta OS belirteçleri artışına bağlı olarak lipid peroksidasyon ürünlerinin artması ve antioksidan enzimlerin ise azaldığını gösteren bulgularımız daha önce yapılan çalışmanın bulguları ile benzerlik göstermektedir (Alkan Uçkun & Öz, 2020). Bu bulgular, Pb'nin neden olduğu böbrek hasarının öncelikli olarak OS tarafından yönlendirildiğini belirten önceki raporları desteklemektedir (Diaz vd., 2025; Yaman vd., 2025). Bulgularımızla uyumlu olarak yapılan bir çalışmada Cr ve NH<sub>3</sub>'e eş zamanlı maruz kalma karaciğer ve böbrek dokularında GST, CAT ve SOD dahil olmak üzere OS enzimlerinde önemli bir artışa yol açtığı bildirilmiştir (Mulla vd., 2025). AChE, sinir sistemi hastalıkları için önemli bir biyobelirteç olmasının yanı sıra, hassas ve doğru bir şekilde tespit edilmesi özellikle hastalıkların teşhisi ve ilaç taramaları için büyük önem taşımaktadır (Jin vd., 2025). AChE'nin aşırı ekspresyonu, asetilkolin sinyal iletiminin bozulmasında önemli bir rol oynar ve özellikle AChE aktivitesinin tespiti, AD'nin ilerlemesinin anlaşılması ve etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Xiang vd., 2025).

Bulgularımızla uyumlu olarak yapılan başka bir çalışmada tehlikeli aromatik aminlerden biri olan anilin ile maruziyet sonucu bir tatlı su balığı olan *Channa punctatus*'un karaciğer, solungaç ve böbreklerinde AChE, GST ve MDA artışı ile dokularda çok sayıda biyomoleküllerde değişiklikler ve yapısal anormallikler olduğu gözlenmiştir (Sharma & Chadha, 2024). Yapılan başka bir çalışmada ise *Nigella sativa*, *Capsicum annum*, *Piper guineense*, *Capsicum carvi*, *Elettaria cardamomum*, *Zingiber officinale*, *Piper nigrum*, *Cinnamomum verum* ve *Curcuma longa* gibi yaygın olarak kullanılan dokuz baharatta toksik elementlerden özellikle Pb, Cr ve Cu konsantrasyonlarının önerilen seviyeden yüksek olması nedeni ile bu baharatları tüketen insanların kanser olma riski taşıdıkları bildirilmiştir (Islam vd., 2025). Yapılan başka bir çalışmada ise meme karsinomlu hastaların ortalama Cr, Cu, Pb ve Cd düzeylerinin tırnaklarda ve kanda anlamlı şekilde yükseldiği belirlenmiştir (Qayyum vd., 2025).

Önceden yapılan başka bir çalışmada ise lipid peroksidasyon ürünlerinin ve hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan GST'nin indüksiyonunun, düşük seviyelerde geçici OS'e karşı erken adaptif bir yanıt olabileceği bildirilmiştir (Singhal vd., 1999). GST'nin biyolojik sistemlerde genel olarak karsinojenlere, antitümör ilaçlara, çevre kirleticilerine ve OS ürünleri gibi tehlikeli maddelere maruziyet sonucu indüklendiği tespit edilmiştir (Hayes & Pulford, 1995; Sadler & von Elert, 2014). Balıklar üzerinde yapılan bir çalışmada bir fungusit olan azoksistrobin'e maruziyet sonucu bulgularımızla uyumlu olarak ROS artışına bağlı olarak GST artarken GR'nin ise azaldığı görülmüştür (Vieira vd., 2021). GST'nin özellikle metal toksisitesine karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir (Valenzuela-Chavira vd., 2021). Bulgularımız, PbAc maruziyetinin karaciğer dokularında MDA düzeylerini artırıp GSH, GR ve CaE düzeylerini azaltarak oksidatif ve toksik hasara neden olduğunu bildiren çalışmalarla paralellik göstermektedir (Ozkaya vd., 2018). Bulgularımızla uyumlu olarak Cu piriton (CuPT) ve çinko piriton (ZnPT) gibi sucul ortamlarda yaygın ve tehlikeli kirleticiler olan antifoulantlar deniz misidi (*Neomysis awatchensis*)'nde GSH tükenmesi sonucu GR ve GPx'da önemli azalmalara neden olduğu bildirilmiştir (Lee vd., 2024).

Bununla birlikte Pb ile birlikte N uygulaması Pb maruziyetine bağlı olarak OS sonucu artan AChE, GST, MDA seviyelerini azalttığı CaE, GR, GSH seviyelerinin ise önemli ölçüde yükselmiş olduğu gözlenmiştir. Bulgularımız CCl4 ile birlikte nar suyu tedavisinin oksidatif belirteçleri ve apoptozu azaltarak CCl4 kaynaklı OS ve toksisiteye

karşı koruyucu potansiyel etki gösterdiğini bildiren çalışmanın sonuçları ile uyumludur (Kalkan vd., 2024). Bulgularımızla uyumlu olarak yapılan önceki bir çalışmada krisin'in antioksidan özelliği nedeniyle PbAc kaynaklı lipid peroksidasyonunu azalttığı ve CAT, SOD, GPx aktiviteleri ve GSH düzeylerini artırdığı sonuç olarak krisin'in PbAc'nin neden olduğu böbrek toksisitesini önemli ölçüde hafiflettiği gösterilmiştir (Kucukler vd., 2021). Yapılan başka bir çalışmada ise kolon kanserinin nedeninden sorumlu çevresel bir toksin olan 1,2-Dimetilhidrazin'e karşı kullanılan hesperetin'in GR, GPx, GST, GSH ve SOD gibi çeşitli antioksidan proteinlerin seviyesini önemli ölçüde artırdığı ve lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde iyileştirdiğini gösterdikleri çalışmanın bulguları sonuçlarımız ile benzerdir (Shree vd., 2022).

Çalışmamızda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PbAc grubunda PI3K ve Akt1 gen ekspresyon düzeyleri ile immünreaktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı biçimde arttığı tespit edildi. Bulgularımız, PI3K/Akt ekspresyon düzeylerindeki bu artışın PbAc'nin ROS'un aşırı üretimi üzerinden OS'yi tetikleyerek DNA zincir kırıkları ve kromozomal sapmalara yol açtığını ve sonuç olarak DNA hasarına neden olarak güçlü bir genotoksik potansiyel sergilediğini bildiren çalışma ile uyumludur (Sarkar vd., 2025).

Bulgularımızla uyumlu olarak yapılan başka bir çalışmada ise Pb'nin TLR4 reseptörünü ve ardından PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunu aktive ettiği, böbrek doku hücrelerinin otofajisini inhibe ederek böbrek hasarını indüklediği bildirilmiştir (Xie vd., 2024). Artan kanıtlar, PI3K/Akt yolunun sinyal iletimi, kanser hücrelerinin çoğalması, göçü ve invazyonunda kritik bir rol oynadığını göstermiştir (Tan vd., 2024; Valivand vd., 2024). Yapılan başka bir çalışmada ise PI3K/Akt yolunun aktive edilmesinin mitokondriyal disfonksiyona, OS'ye ve erken yaşlanmaya yol açtığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2025b). OS, hücrel oksidasyon ve anti-oksidasyon mekanizmaları arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve fizyolojik sağlık üzerinde çeşitli zararlı etkilere yol açar (Li vd., 2025a). Bulgularımızla uyumlu olarak tehlikeli bir metal olan civa klorürün (HgCl<sub>2</sub>) PI3K/Akt yolunu aktive ederek nefrotoksositeye neden olduğu bildirilmiştir (Kadry & Abdel Megeed, 2022). Bulgularımız Hg maruziyetinin PTEN genini aşağı düzenlediğini, PI3K/Akt düzenleyici yolunun ise aktive ederek ve inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu artırarak böbrek inflamasyonuna yol açtığını bildiren çalışmanın bulguları ile benzerdir (Mei vd., 2024). Başka bir çalışmada, Ti'nin sıçan akciğerlerinde birikebildiği, akciğer dışı organlara geçerek OS'ye yol açtığı ve bunun

sonucunda PI3K-Akt-FOXO3a yolunu aktive ederek DNA hasarını tetiklediği bildirilmiş olup, bu bulgular çalışmamızla benzerlik göstermektedir (Han vd., 2020). Yapılan başka bir çalışmada ise Pb, Cr, Cd, As ve Ni gibi ağır metallerin metastatik kanserin önemli özelliklerinden biri olan hücre göçünü indükleyebildiği ve DNA metiltransferaz aktivitesinin yukarı regülasyonuna neden olarak kanser gelişimi ve ilerlemesinde rol oynadığı tespit edilmiştir (Saini vd., 2025). Mevcut çalışmada Pb + N grubunda Pb grubu ile kıyaslandığında PI3K/Akt1 gen ekspresyon düzeyleri ve immünreaktivitesinin azaldığını tespit ettik. Bulgularımızla uyumlu olarak antikanser özelliğe sahip olan L-metilselenosisteinin özofagus kanseri hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Ji vd., 2025). Başka bir çalışmada ise antioksidan olan timokinon, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun aktivasyonunu inhibe ederek, apoptotik proteinlerin ve SOX ailesinin çekirdek üyelerinin ekspresyonunu düzenleyerek akut miyeloid lösemi hücrelerinin proliferasyonunu engellediği tespit edilmiştir (Lin vd., 2025). Yapılan başka bir çalışmada ise hesperidin ve salinomisin lösemi kanser hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolunu etkili bir şekilde engelleyebildiği gösterilmiştir (Abroon vd., 2025). Bulgularımızla benzer olarak doğal bir flavonoid metaboliti olan scutellarin'in PI3K/Akt, MAPK ve NF- $\kappa$ B vb. temel inflamasyon yollarını inhibe ettiği ve Nrf2, ARE vb. antioksidan ilişkili yolları ise aktive ettiği ve sonuçta böbrek dokularını inflamasyon ve OS'den koruyabildiği tespit edilmiştir (Zhou vd., 2024).

Çalışmamızda böbrek dokularında yapılan histopatolojik incelemelerde, Pb grubunda belirgin ödem ve konjesyonun yanı sıra tübüler ve glomerüler dejenerasyon, infiltrasyon, tübüler hücre dökülmesi ve bağ dokusu artışının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, böbrek parankiminde hasarın en yüksek düzeyde gerçekleştiğini göstermekte olup, literatürdeki güncel çalışmalarla uyumludur (Haj-Khlifa vd., 2025; Yaman vd., 2025). Organizmalardan Pb atılımı sırasında, Pb'nin böbrek korteksinde birikerek böbrek fonksiyon bozukluğuna yol açtığı tespit edilmiştir (Jing vd., 2025). Yapılan bir çalışmada Pb'nin genel olarak OS indüksiyonu, esansiyel kation etkileşimi, inflamasyon ve glomerüler ile tübüler hücre apoptozunun indüksiyonu da dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla böbrek hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Vukelić vd., 2023). Yapılan başka bir çalışmada ise bulgularımızla benzer olarak böbreklerde Cd'ye maruziyet sonucunda serum CREA ve BUN seviyelerinde artış ve böbrek reabsorpsiyon ile filtrasyonunda bozulma, masif inflamatuvar hücre

infiltrasyonu, fırça kenarı kaybı, tübüler desenin belirgin oluşumu ve böbrek tübüllerinin genişlemesi ile karakterize edilen böbreklerde hasar meydana geldiği tespit edilmiştir (Li vd., 2025b). Bununla birlikte Pb ile birlikte N uygulamasının Pb maruziyetine bağlı olarak histopatolojik değişiklikleri azalttığı gözlenmiştir. Bulgularımız daha önce yapılan Pb kaynaklı böbrek hasarının azaltılmasında bir antioksidan olan CoQ10'un histopatolojik değişiklikleri hafiflettiğini bildiren çalışmanın bulguları ile benzerdir (Al-Megrin vd., 2020). Antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-tümör özelliklere sahip olan astragaloside IV'ün, Nrf2/HO-1 yolunu düzenleyerek Cd kaynaklı mitokondri aracılı apoptozu engellediği ve böylece böbreği ağır metal toksisitesine karşı koruyarak potansiyel bir nefroprotektif ajan olarak kullanılabileceğini ileri süren çalışmalar, bulgularımızla uyum göstermektedir (Li vd., 2025b).

Çalışmamızda ayrıca, PbAc toksisitesinin böbrekte esansiyel metallerle etkileşimi yoluyla önemli ölçüde modüle edilebildiği dikkate alınarak Cu, Fe, Zn, Ca, Mn, Pb ve Mg seviyeleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, PbAc maruziyeti sonucunda Cu, Fe, Zn ve Ca seviyelerinde azalma, buna karşılık Mn, Pb ve Mg seviyelerinde artış saptanmıştır. Bu bulgu, vücuttaki mineral dengesinin toksik Pb maruziyeti sırasında önemli homeostatik mekanizmalar aracılığıyla düzenlendiğini ve Pb'nin esansiyel metallerle rekabet halinde olduğunu göstermektedir (Lopez-Alonso vd., 2004). Yapılan bir çalışmada, Pb toksisitesinin önemli mekanizmalarından birinin; proteinlerin metal bağlama bölgelerindeki Ca, Cu, Fe ve Mn gibi esansiyel metallerin, yapısal olarak benzer Cd ve Pb gibi ağır metallerle yer değiştirmesi olduğu bildirilmiştir. Bu değişim, hidrojen peroksidin ayrışmasını katalize ederek hidroksil radikalleri gibi zararlı ROS oluşumuna yol açmakta ve bunun sonucunda lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar vermektedir (Jomova vd., 2025). Yapılan başka bir çalışmada ise meme tümör virüsü ile enfekte edilen farelerin içme suyu aracılığıyla Pb'a maruz bırakıldığında, karaciğer, böbrek ve saç dokularında Zn, Cu, Fe ve Cr düzeylerinde değişiklik meydana geldiği ve bu durumun tümör gelişimine yol açtığı rapor edilmiştir (Schrauzer, 2008). Yapılan bir çalışmada Mg gibi kimyasal elementlerin insan için elzem olmasının yanı sıra yüksek dozlarda emildiklerinde toksik olduğu bildirilmiştir (Gore vd., 2010). Bulgularımızla uyumlu olarak yapılan bir çalışmada, farelerin Pb'ye maruz bırakılması sonucunda böbreklerde Pb'nin önemli ölçüde biriktiği, glomerül çevresinde lökosit infiltrasyonlarının görülerek inflamasyona yol açtığı ve buna fosfor (P), Ca, Cu ile selenyum (Se) gibi elementlerin

endojen böbrek konsantrasyonlarında belirgin bir azalmanın eşlik ettiği bildirilmiştir (Gluhcheva vd., 2022).

Yapılan bir araştırmada ölü bulunan yavru kargaların (*Corvus frugilegus*; 1 ila 13 günlük) beş dokusunda (karaciğer, akciğer, böbrek, kas ve kemik) Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn ve Co gibi elementlerin yanı sıra Cd ve Pb gibi toksik metallerin konsantrasyonu ölçülmüş ve bu toksik maddelerin kargalarda bulunmasının tarım alanlarında bulunan pestisit kullanımı sonucu gerçekleştiği sonucuna varılmıştır (Orłowski vd., 2012). Yapılan başka bir çalışmada ise *Drosophila melanogaster*'in Pb ile maruziyeti sonucu, Pb'nin mitokondriyi hedef alarak mitoferrin ekspresyonunu inhibe ettiği ve Fe homeostazını bozarak mitokondride Fe eksikliğine yol açtığını sonuç olarak ekdizon sentezini inhibe ederek gelişimsel toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2025). Yapılan son çalışmada gebelik sırasında kullanılan kırmızı kan hücresi içeren transfüzyon torbalarındaki Hg, Cd, Pb ve As düzeyleri değerlendirilmiş ve özellikle fetal anemide Pb açısından hem bu torbaların içeriklerinin hem de kan bağışçılarının kanlarının toksik metaller açısından önceden taranmasının kritik önemi vurgulanmıştır (Al-Saleh vd., 2025).

Çalışmamızda PbAc+N grubunda esansiyel minerallerin oranının iyileştiği gözlenmiştir. Bulgularımızla uyumlu olarak yapılan bir çalışmada nar (*Punica granatum* L.) suyunun alüminyum klorür (AlCl<sub>3</sub>) maruziyeti sonucu eser element seviyelerindeki değişimleri kontrol ederken, dokulardaki Al birikimini ve OS'yi büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Ciftci vd., 2024). Yapılan başka bir çalışmada bulgularımızla uyumlu olarak PbAc kaynaklı böbrek toksisitesi üzerine krisin'in koruyucu etkileri araştırılmış ve sonuç olarak krisinin, böbrek dokusunda Pb, Zn, Fe, Na ve Cu içeriğini azaltırken, potasyum (K) ve Ca içeriğini artırdığı ve PbAc'nin neden olduğu böbrek toksisitesini önemli ölçüde hafiflettiği gösterilmiştir (Kucukler vd., 2021). Bu sonuçlar, antioksidan olan N'nin ağır metal olan PbAc kaynaklı böbrek hasarını engellemek için terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mevcut çalışmada, PbAc'nin sıçan böbreklerindeki toksisitesine karşı N'nin koruyucu etkisi; biyokimyasal parametreler, gen ekspresyon düzeyleri, element analizleri, oksidatif stres biyobelirteçleri ve histopatolojik bulgular aracılığıyla ortaya konmuştur. Bununla birlikte, PbAc'nin ROS üretimi üzerinden böbrek üzerindeki etki mekanizması önceki çalışmalarda kapsamlı biçimde incelenmemiştir. Bu nedenle, çalışmamızda PbAc toksisitesine karşı N'nin koruyucu rolüne ilişkin, özellikle böbrek hasarının ilerlemesi ve iyileşmesinde anahtar konumda bulunan sinyal moleküllerinin işlevine dair daha fazla kanıt sunulmaktadır. Bulgularımıza göre Pb, ratların böbreklerinde ROS üretimini artırarak OS'ye neden olmuş ve sonuç olarak hücrelerde esansiyel elementlerin seviyelerini değiştirerek, lipid peroksidasyonu artırarak ve antioksidan enzim seviyelerini ise azaltarak hücrel hasara neden olmuştur. Bu çalışma, PbAc'nin ROS üretimini uyararak PI3K/AKT sinyal yolunun aktivasyonunu *in vivo* koşullarda indüklediğini ortaya koymuştur. Bulgularımız, PbAc'nin oluşturduğu nefrotoksitenin ilerlemesi sonucu vücut sağlığı açısından zararlı etkilerinin hafifletebilmesinde PI3K/AKT yolunun terapötik bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, çalışmamızda PbAc maruziyeti sonucunda Cu, Fe, Zn ve Ca seviyelerinde azalma; Mn, Pb ve Mg seviyelerinde ise artış saptanmıştır. Bu bulgular, PbAc'nin oksidan enzim seviyelerini artırırken, antioksidanların düzeylerini azalttığını göstermektedir. Çalışmamızda incelenen biyobelirteçlerde gözlenen bu değişimlerin, organizmaların çevrede bulunma olasılığı yüksek olan PbAc gibi ağır metallere maruziyet sonucu ortaya çıkan toksik etkilerle başa çıkabilmek için geliştirdiği bir adaptasyon mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma ağır metallerin ekotoksikolojik etkilerinin saha çalışmalarıyla izlenmesi ihtiyacını göstermektedir. PbAc toksisitesine karşı kullandığımız N ise PI3K/AKT, esansiyel elementler, histopatolojik ve oksidan etkileri tersine çevirmiştir. Bu sonuçlar, bir antioksidan olan N'nin, ağır metal PbAc'ye bağlı böbrek hasarını engellemede PI3K/AKT ekspresyonlarını hedeflemesinin yanı sıra OS'yi azaltıcı etkisiyle de terapötik bir ajan olarak değerlendirilebileceğini ortaya koyan ilk çalışmadır. Çalışmanın sonuçları PI3K/AKT yolağının aktivasyonunu düzenleyen mekanizmanın anlaşılmasında ve PbAc kaynaklı böbrek toksisitesini azaltmak için yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde faydalı olabilir. Ancak daha fazla klinik araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKÇA

- Abroon, S., Nouri, M., & Mahdavi, M. (2025). "Hesperidin/Salinomycin Combination; a Natural Product for Deactivation of the PI3K/Akt Signaling Pathway and Anti-Apoptotic Factors in KG1a Cells". *Journal of Fluorescence*, 35(6), 4005–4014.
- Ai-Rufaei, I. A., Ali, S. A., Kareem, D. A., & Majeed, M. F. (2025). "Single and combined effects of lead and piroxicam on the structural and functional profiles of the liver and kidney". *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 53(3), 328–335.
- Aktümsek, Abdurrahman, *Anatomi ve Fizioloji İnsan Biyolojisi*, Nobel Yayın Dağıtım, 5. Baskı, Ankara, 2010.
- Alam, M., Ahsan, F., Mahmood, T., Shamim, A., Parveen, S., Shariq, M., & Ahmad Ansari, V. (2022). "Meticulous parade on naringin respecting its pharmacological activities and novel formulations". *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 12(5), 457-474.
- Alhalmi, A., Amin, S., Ralli, T., Ali, K. S., & Kohli, K. (2025). "Therapeutic role of naringin in cancer: molecular pathways, synergy with other agents, and nanocarrier innovations". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 398(4), 3595–3615.
- Ali, M. U., Gulzar, M. Z., Sattar, B., Sehar, S., Abbas, Q., Adnan, M., Sun, J., Luo, Z., Hu, G., Yu, R., & Wong, M. H. (2025). "Silent threats of lead-based paints in toys and households to children's health and development". *Journal of Hazardous Materials*, 486, 136984.
- Alkan Uçkun, A., & Barım Öz, Ö. (2020). "Acute exposure to the fungicide penconazole affects some biochemical parameters in the crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823)". *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(28), 35626–35637.
- Al-Megrin, W. A., Soliman, D., Kassab, R. B., Metwally, D. M., Ahmed E Abdel Moneim, & El-Khadragy, M. F. (2020). "Coenzyme Q10 Activates the Antioxidant Machinery and Inhibits the Inflammatory and Apoptotic Cascades Against Lead Acetate-Induced Renal Injury in Rats". *Frontiers In Physiology*, 11, 64.
- Al-Saleh, I., Alnuwaysir, H., Al-Rouqi, R., Aldhalaan, H., & Tulbah, M. (2025). "Fetal exposure to toxic metals (mercury, cadmium, lead, and arsenic) via intrauterine blood transfusions". *Pediatric Research*, 97(2), 647–654.
- Aryal, B., Kwakye, J., Ariyo, O. W., Ghareeb, A. F. A., Milfort, M. C., Fuller, A. L., Khatiwada, S., Rekaya, R., & Aggrey, S. E. (2025). "Major Oxidative and Antioxidant Mechanisms During Heat Stress-Induced Oxidative Stress in Chickens". *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 14(4), 471.
- Babu, M., Rao, R. M., Babu, A., Jerom, J. P., Gogoi, A., Singh, N., Seshadri, M., Ray, A., Shelley, B. P., & Datta, A. (2025). "Antioxidant Effect of Naringin Demonstrated

Through a Bayes' Theorem Driven Multidisciplinary Approach Reveals its Prophylactic Potential as a Dietary Supplement for Ischemic Stroke". *Molecular Neurobiology*, 62, 3918–3933.

Bharti S, A. K., & Gopalakrishnan, A. V. (2025). "Lead-Induced Nephrotoxicity and Its Therapeutic Interventions: An Updated Review". *Biological Trace Element Research*, 10.1007/s12011-025-04692-0. Advance online publication.

Barregard, L., Sallsten, G., Lundh, T., & Mölne, J. (2022). "Low-level exposure to lead, cadmium and mercury, and histopathological findings in kidney biopsies". *Environmental Research*, 211, 113119.

Battistelli, M., Malatesta, M., & Meschini, S. (2016). "Oxidative Stress to Promote Cell Death or Survival". *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2016, 2054650.

Berne, R.M., Levy, M.N., Koeppen, B.M., ve Stanton, B.A. (2005). *Fizyoloji*. (çev.:Türk Fizyolojik Bilimler Derneği). Ankara: Öncü Basımevi. (2008).

Bradford M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

Bu, L., Wang, H., Pan, J. A., Chen, L., Xing, F., Wu, J., Li, S., & Guo, D. (2021). "PTEN suppresses tumorigenesis by directly dephosphorylating Akt". *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 262.

Caetano, E. S. P., Mattioli, S. V., da Silva, M. L. S., Martins, L. Z., Almeida, A. A., da Rocha, A. L. V., Nunes, P. R., Grandini, N. A., Correa, C. R., Zochio, G. P., & Dias-Junior, C. A. (2023). "Sildenafil attenuates oxidative stress and endothelial dysfunction in lead-induced hypertension". *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 133(2), 142–155.

Castañeda, R., Cáceres, A., Cruz, S. M., Aceituno, J. A., Marroquín, E. S., Barrios Sosa, A. C., Strangman, W. K., & Williamson, R. T. (2023). "Nephroprotective plant species used in traditional Mayan Medicine for renal-associated diseases". *Journal of Ethnopharmacology*, 301, 115755.

Cecerska-Heryć, E., Gliźniewicz, M., Grygorcewicz, B., Serwin, N., Stodolak, P., Słodzińska, W., Birger, R., Goszka, M., Polikowska, A., Budkowska, M., Rakoczy, R., & Dołęgowska, B. (2024). "The effect of a rotating magnetic field on the antioxidant system in healthy volunteers - preliminary study". *Scientific Reports*, 14(1), 8677.

Charkiewicz, A. E., & Backstrand, J. R. (2020). "Lead Toxicity and Pollution in Poland". *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(12), 4385.

Chaturvedi, V., Kumari, R., Sharma, P., & Pati, A. K. (2025). "Diverse Fluorescent Probe Concepts for Detection and Monitoring of Reactive Oxygen Species". *Chemistry, An Asian journal*, 20(7), e202401524.

Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H., & Chen, X. (2023). A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(13), 4982.

Ciftci, H., Caliskan, C. E., Koc, H., Ozturk, K., Ozkaya, A., & Erbesler, Z. A. (2024). "Alleviation of Aluminum-Induced Oxidative Stress, Trace Element, and Mineral Levels in Rat Tissues Protective Role of Pomegranate Juice (*Punica Granatum* L.)". *Biological Trace Element Research*, 202(9), 4146–4157.

Collin, M. S., Venkatraman, S. K., Vijayakumar, N., Kanimozhi, V., Arbaaz, S. M., Stacey, R. G. S., Anusha, J., Choudhary, R., Lviv, V., Tovar, G. I., Senatov, F., Koppala, S., ve Swamiappan, S. (2022). "Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects on human: A review." *Journal of Hazardous Materials Advances*, 7, 100094.

Cribb, A. E., Leeder, J. S., & Spielberg, S. P. (1989). "Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)". *Analytical Biochemistry*, 183(1), 195–196.

Dagher, D. M., Zaghloul, M. S., & Suddek, G. M. (2025). "Modulation of AMPK/mTOR Autophagic Pathway Using Dapagliflozin Protects Against Cadmium-Induced Testicular and Renal Injury in Rats". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 39(4), e70257.

Das, S., Murumulla, L., Ghosh, P., & Challa, S. (2025). "Heavy metal-induced disruption of the autophagy-lysosomal pathway: implications for aging and neurodegenerative disorders". *Biometals*, 38(2), 371–417.

de Souza, I. D., de Andrade, A. S., & Dalmolin, R. J. S. (2018). "Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning". *Critical Reviews in Toxicology*, 48(5), 375–386.

Debnath, B., Singh, S., & Manna, K. (2019). "Sources and toxicological effects of lead on human health". *Indian Journal of Medical Specialities*. 10(2), 66-71.

Diaz, J. P., Pena, E., El Alam, S., Matte, C., Cortés, I., Figueroa, L., Siques, P., & Brito, J. (2025). "Chlorella vulgaris Supplementation Attenuates Lead Accumulation, Oxidative Stress, and Memory Impairment in Rats". *Toxics*, 13(4), 313.

El-Khishin, I. A., El-Fakharany, Y. M. M., & Abdel Hamid, O. I. (2015). "Role of garlic extract and silymarin compared to dimercaptosuccinic acid (DMSA) in treatment of lead induced nephropathy in adult male albino rats". *Toxicology Reports*, 2, 824–832.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr, & Feather-Stone, R. M. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001). "Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1(6), 529–539.

Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). "Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy". *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(9), 689–709.

Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T. (2017). "The PI3K pathway in human disease". *Cell*, 170(4), 605–635.

Gembillo, G., Calimeri, S., Tranchida, V., Silipigni, S., Vella, D., Ferrara, D., Spinella, C., Santoro, D., & Visconti, L. (2023). "Lung Dysfunction and Chronic Kidney Disease: A Complex Network of Multiple Interactions". *Journal of Personalized Medicine*, 13(2), 286.

Ghanbari-Movahed, M., Jackson, G., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2021). "A Systematic Review of the Preventive and Therapeutic Effects of Naringin Against Human Malignancies". *Frontiers in Pharmacology*, 12, 639840.

Gluhcheva, Y., Pashkunova-Martic, I., Schaier, M., Vladov, I., Stoykova, S., Petrova, E., Pavlova, E., Dorkov, P., Helbich, T. H., Keppler, B., & Ivanova, J. (2022). "Comparative Effects of Deferiprone and Salinomycin on Lead-Induced Disturbance in the Homeostasis of Intrarenal Essential Elements in Mice". *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4368.

Gonzalez-Villalva, A., Marcela, R. L., Nelly, L. V., Patricia, B. N., Guadalupe, M. R., Brenda, C. T., Maria Eugenia, C. V., Martha, U. C., Isabel, G. P., & Fortoul, T. I. (2025). "Lead systemic toxicity: A persistent problem for health". *Toxicology*, 515, 154163.

Gore, F., Fawell, J., & Bartram, J. (2010). "Too much or too little? A review of the conundrum of selenium". *Journal of Water and Health*, 8(3), 405–416.

Gui, Y., Wang, J., Gou, Q., Yu, X., Yang, Y., Wang, C., Li, L., Gao, W., Liu, W., Wang, H., Shu, X., Zhang, Y., & Shang, J. (2025). "A novel dicyanoisophorone-based fluorescent probe for rapid detection of acetylcholinesterase in biological systems". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 329, 125587.

Gülçin, İ. (2020). "Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview". *Archives of Toxicology*, 94, 651–715.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation". *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139.

Haj-Khlifa, A., Aziz, F., Tastift, M. A., Sellami, S., Rais, H., Hammoud, M., Fdil, N., Kissani, N., Gamrani, H., & Bouyatas, M. M. (2025). "Ameliorative effect of Ononis natrix against chronic lead poisoning in mice: neurobehavioral, biochemical, and histological study". *Biological Trace Element Research*, 203(1), 229–242.

Han, B., Pei, Z., Shi, L., Wang, Q., Li, C., Zhang, B., Su, X., Zhang, N., Zhou, L., Zhao, B., Niu, Y., & Zhang, R. (2020). "TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Caused DNA Damage in Lung and Extra-Pulmonary Organs Through ROS-Activated FOXO3a Signaling Pathway After Intratracheal Administration in Rats". *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6279–6294.

Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance". *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 445–600.

He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). "Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species". *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 44(2), 532–553.

He, Y., Sun, M. M., Zhang, G. G., Yang, J., Chen, K. S., Xu, W. W., & Li, B. (2021). "Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy". *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 425.

Ho, H. J., & Shirakawa, H. (2022). "Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Chronic Kidney Disease". *Cells*, 12(1), 88.

Hu, Y., Liu, L., Wang, Z., Jiang, C. P., Zhu, Z., Li, H., Zeng, Q., Xue, Y., Wu, Y., Wang, Y., Yi, Y., Zhu, H., Shen, C., & Liu, Q. (2022). "Network pharmacology, molecular docking and in vivo and in vitro experiments to explore the molecular mechanism of licorice green tea beverage to scavenge oxygen free radicals". *Journal of Food Biochemistry*, 46(10), e14315.

Huang, Y. S., Wang, S. H., Chen, S. M., & Lee, J. A. (2018). "Metabolic profiling of metformin treatment for low-level Pb-induced nephrotoxicity in rat urine". *Scientific Reports*, 8(1), 14587.

Islam, M. S., Antu, U. B., Akter, R., Hossain, M. S., Ahmed, S., Roy, T. K., Ismail, Z., & Idris, A. M. (2025). "Preliminary Assessment of Essential and Potentially Toxic Elements in the Most Common Spices in a Developing Country: Health Hazard Implication". *Biological Trace Element Research*, 10.1007/s12011-025-04625-x. Advance Online Publication.

Jain R. B. (2019a). "Co-exposures to toxic metals cadmium, lead, and mercury and their impact on unhealthy kidney function". *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(29), 30112–30118.

Jain R. B. (2019b). "Lead and kidney: Concentrations, variabilities, and associations across the various stages of glomerular function". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 54, 36–43.

Ji, K., Wu, S., Yuan, J., Wang, Y., Li, G., Wang, L., Wang, S., Wang, L., Li, H., & Wang, C. (2025). vL-Selenomethylselenocysteine Exerts Inhibitory Effects on the Progression of Esophageal Cancer by Targeting the PI3K/AKT Signaling Pathway". *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 10.2174/0115748928355152250527060605. Advance Online Publication.

Jin, X., Shao, Y., Zhu, S., Liao, Y., Zheng, Y., Ying, X., & Liu, X. (2025). "Dual-modal biosensor based on proton-modulated mechanism integrated nanozyme for acetylcholinesterase analysis". *Analytica Chimica Acta*, 1360, 344136.

Jing, S., Ge, Y., Pan, J., Chang, P., & Qiao, X. (2025). "The independent and interactive effects of heavy metal pollution and vitamin D deficiency on early kidney injury indicators: analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004". *BMC Public Health*, 25(1), 719.

Jomova, K., Alomar, S. Y., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2025). "Heavy metals: toxicity and human health effects". *Archives of Toxicology*, 99(1), 153–209.

Kadry, M. O., & Abdel Megeed, R. M. (2022). "Ubiquitous toxicity of Mercuric Chloride in target tissues and organs: Impact of Ubidecarenone and liposomal-Ubidecarenone STAT 5A/ PTEN /PI3K/AKT signaling pathways". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 74, 127058.

Kalkan, Ö. F., Türk, A., Çitil, C., Uçkun, M., Özkaya, A., Yoloğlu, E., Özay, Y., Çağrı Bülbül, Ş., Şahin, Z., & Kırbaş, A. (2024). "Pomegranate juice treatment reverses carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced increased acetylcholinesterase activity and cell death via suppression of oxidative stress in rats". *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 75(3), 293–302.

Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). "Antioksidanlar". *MAE Vet Fak Derg*, 1(1), 65-76.

Karrari, P., Mehrpour, O., & Abdollahi, M. (2012). "A systematic review on status of lead pollution and toxicity in Iran; Guidance for preventive measures". *Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 20(1), 2.

Krishnamurthy, H.K., Pereira, M., Rajavelu, I., Jayaraman, V., Krishna, K., Wang, T., Bei, K., ve Rajasekaran, J.J. (2024). "Oxidative stress: fundamentals and advances in quantification techniques." *Frontiers in Chemistry*, 12, 1470458.

Kucukler, S., Benzer, F., Yildirim, S., Gur, C., Kandemir, F. M., Bengu, A. S., Ayna, A., Caglayan, C., & Dortbudak, M. B. (2021). "Protective Effects of Chrysin Against Oxidative Stress and Inflammation Induced by Lead Acetate in Rat Kidneys: a

Biochemical and Histopathological Approach". *Biological Trace Element Research*, 199(4), 1501–1514.

Küpeli, S., (2022). "Kanserde hedefe yönelik tedavi: PI3K/Akt/mTOR kullanıldı". *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 31(1), 15–20.

Lee, S., Haque, M. N., Lee, D. H., & Rhee, J. S. (2024). "The Effects of Co-Exposure to Antifoulants and Microplastics on the Survival, Oxidative Status, and Cholinergic System of a Marine Mysid". *Toxics*, 12(9), 651.

Lee, S. W., Lim, J. M., Jeong, H. J., Lee, G. M., Seralathan, K. K., Park, J. H., & Oh, B. T. (2025). "Lead (Pb) removal and suppression of Pb-induced inflammation by *Lactocaseibacillus rhamnosus* A6-6". *Letters in Applied Microbiology*, 78(4), ovaf039.

Lentini, P., Zanolì, L., Granata, A., Signorelli, S. S., Castellino, P., & Dell'Aquila, R. (2017). "Kidney and heavy metals - The role of environmental exposure (Review)". *Molecular Medicine Reports*, 15(5), 3413–3419.

Li, L., Guo, Z., Zhao, Y., Liang, C., Zheng, W., Tian, W., Chen, Y., Cheng, Y., Zhu, F., & Xiang, X. (2025a). "The impact of oxidative stress on abnormal lipid metabolism-mediated disease development". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 766, 110348.

Li, Y., Zhou, J., Zhang, T., Li, X., Wu, C., Zhao, Z., Tang, J., Tan, X., Hu, Q., & Liao, W. (2025b). "Astragaloside IV attenuates cadmium induced nephrotoxicity in rats by activating Nrf2". *Scientific Reports*, 15(1), 2028.

Lin, J., Zeng, F-L., Liu, Y-Q., Yan, Z-M., Li, Z-T., Xu, Q-L., Zhu, H-Q. (2025). "Molecular Mechanism of Thymoquinone Inhibition on Malignant Proliferation of Acute Myeloid Leukemia Cells". *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 33(2), 311-318.

Liu, Z. H., Zhai, Y., Zhang, J., Huang, W., Li, W., & Qin, W. (2025). "Mitochondrial iron deficiency mediated inhibition of ecdysone synthesis underlies lead (Pb) induced developmental toxicity in *Drosophila melanogaster*". *Toxicology and Applied Pharmacology*, 497, 117283.

López Alonso, M., Prieto Montaña, F., Miranda, M., Castillo, C., Hernández, J., & Luis Benedito, J. (2004). "Interactions between toxic (As, Cd, Hg and Pb) and nutritional essential (Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) elements in the tissues of cattle from NW Spain". *Biometals*, 17(4), 389–397.

Lu, P., Huang, H., Liu, J., Cao, Y., Hua Liu, S., & Yin, J. (2025). "Small Molecule Fluorescent Probes for Glutathione S-Transferase". *Chembiochem*, 26(9), e202400994.

Lyu, T., Liu, X., Liu, Y., Yang, Z., Li, P., Lu, Y., Zhao, P., Chen, J., & Ye, C. (2025). "Naringin in repairing articular cartilage injury by activating TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway to attenuate inflammatory response". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 768, 110396.

Martini, M., De Santis, M. C., Braccini, L., Gulluni, F., & Hirsch, E. (2014). "PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review". *Annals of Medicine*, 46(6), 372-383.

Mei, P., Ding, E. M., Yin, H. Y., Ding, X. X., Wang, H., Wang, J. F., Han, L., Zhang, H. D., & Zhu, B. L. (2024). "Downregulation of Serum PTEN Expression in Mercury-Exposed Population and PI3K/AKT Pathway-Induced Inflammation". *Biomedical and Environmental Sciences : BES*, 37(4), 354-366.

Miricescu, D., Balan, D. G., Tulin, A., Stiru, O., Vacaroiu, I. A., Mihai, D. A., Popa, C. C., Papacoccea, R. I., Enyedi, M., Sorin, N. A., Vatachki, G., Georgescu, D. E., Nica, A. E., & Stefani, C. (2021). "PI3K/AKT/mTOR signalling pathway involvement in renal cell carcinoma pathogenesis (Review). *Experimental and therapeutic medicine*, 21(5), 540.

Moron, M. S., Depierre, J. W., & Mannervik, B. (1979). "Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver". *Biochimica et Biophysica Acta*, 582(1), 67-78.

Mulla, A. N., Thorat, S. T., Chandramore, K., Kumar, P., Reddy, K. S., & Kumar, N. (2025). "Curcumin as a protective agent against chromium and ammonia toxicity using molecular and biochemical approaches in fish". *Scientific Reports*, 15(1), 12023.

Neha, V., Parithathvi, A., & Dsouza, H. S. (2025). "Ameliorative role of bioactive compounds against lead-induced neurotoxicity". *Neuroscience*, 568, 46-56.

Ngo, V., & Duennwald, M. L. (2022). "Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease". *Antioxidants*, 11(12), 2345.

Obeng-Gyasi E. (2019). "Sources of lead exposure in various countries". *Reviews on Environmental Health*, 34(1), 25-34.

Ooka, M., Zhao, J., Zhang, L., Huang, R., Sakamuru, S., TeKrony, C., Hsieh, J. H., Collins, B. J., Dunnick, J. K., Dixon, D., & Xia, M. (2025). "Profiling of Environmental Mixtures Containing Metals for Their Toxicity Pathways and Mechanism of Action". *Environmental Science & Technology*, 59(10), 4778-4787.

Orłowski, G., Kamiński, P., Kasprzykowski, Z., Zawada, Z., Koim-Puchowska, B., Szady-Grad, M., & Klawe, J. J. (2012). "Essential and nonessential elements in nestling rooks *Corvus frugilegus* from eastern Poland with a special emphasis on their high cadmium contamination". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(4), 601-611.

Ozkaya, A., Sahin, Z., Kuzu, M., Saglam, Y. S., Ozkaraca, M., Uckun, M., Yologlu, E., Comakli, V., Demirdag, R., & Yologlu, S. (2018). "Role of geraniol against lead acetate-mediated hepatic damage and their interaction with liver carboxylesterase activity in rats". *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(1), 80-87.

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z. (2015). “Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri”. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.

Özmen, O., Akay, M. T., Eraslan, G., & Şimşek, N. (1998). “Effects of methyl parathion on some biochemical changes in rats”. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 22, 211-216.

Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C., Mei, W., & Zeng, C. (2022). “PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? ”. *Frontiers in Oncology*, 12, 819128.

Pitocco, D., Zaccardi, F., Di Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S. A., Zuppi, C., & Ghirlanda, G. (2010). “Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes”. *The Review of Diabetic Studies : RDS*, 7(1), 15–25.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). “Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763.

Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). “Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems”. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359–364.

Qayyum, M. A., Mahmood, S., Bahadur, A., Iqbal, S., Zidan, A., Saad, M., Mahmood, M. H., Farooq, T., Batool, M., Atif, M., Jaber, F., Rahman, K. M., Farooq, Z., Asiri, Y. A., Farouk, A. E., & Aloufi, S. (2025). “Study of toxic and essential elemental imbalances at more advance stage of breast carcinoma patients”. *Pathology, Research and Practice*, 269, 155866.

Qiao, L., Li, M., Wen, X., Deng, F., Hou, X., Zou, Q., Liu, H., Fan, X., & Han, J. (2025). “Epidemiological trends in the burden of chronic kidney disease due to lead exposure in China from 1990 to 2021 compared to global, and projections until 2050”. *International Journal of Environmental Health Research*, 1–12. Advance Online Publication.

Rastogi S. K. (2008). “Renal effects of environmental and occupational lead exposure”. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 12(3), 103–106.

Ray, N., & Reddy, P. H. (2023). “Structural and physiological changes of the kidney with age and its impact on chronic conditions and COVID-19”. *Ageing Research Reviews*, 88, 101932.

Reynoso-García, M. F., Nicolás-Álvarez, D. E., Tenorio-Barajas, A. Y., & Reyes-Chaparro, A. (2025). “Structural Bioinformatics Applied to Acetylcholinesterase Enzyme Inhibition”. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(8), 3781.

Rivoira, M. A., Rodriguez, V., Talamoni, G., & Tolosa de Talamoni, N. (2021). "New Perspectives in the Pharmacological Potential of Naringin in Medicine". *Current Medicinal Chemistry*, 28(10), 1987–2007.

Sachdeva, C., Thakur, K., Sharma, A., & Sharma, K. K. (2018). "Lead: Tiny but Mighty Poison". *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, 33(2), 132–146.

Sadler, T., & von Elert, E. (2014). "Dietary exposure of Daphnia to microcystins: no in vivo relevance of biotransformation". *Aquatic Toxicology*, 150, 73–82.

Saini, D., Chaudhary, P. K., Verma, G. K., Chaudhary, J. K., Kumar, R., Saha, S., Roy, P., Goyal, B., Prasad, R., & Mirza-Shariff, A. A. (2025). "Molecular mechanistic approach to reveal decitabine's effect on DNMT gene modulation and its inhibitory role in heavy metal-induced proliferation in urinary bladder cancer cell line". *Toxicology in Vitro : an International Journal Published in Association With BIBRA*, 108, 106082.

Saleh, S. R., Agwah, R. G., Elblehi, S. S., Ghareeb, A. Z., Ghareeb, D. A., & Maher, A. M. (2025). "Combination of 10-hydroxy-decanoic acid and ZnO nanoparticles abrogates lead acetate-induced nephrotoxicity in rats: targeting oxidative stress and inflammatory signalling". *BMC Pharmacology & Toxicology*, 26(1), 69.

Santhoshkumar, P., & Shivanandappa, T. (1999). "In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver". *Chemico-Biological Interactions*, 119-120, 277–282.

Sarkar, O., Mukherjee, S., Islam, S., & Chattopadhyay, A. (2025). "Erythrocytic nuclear abnormalities and apoptotic gene dysregulation in zebrafish organs: Individual and combined genotoxic effects after lead and chromium exposure". *The Science of the Total Environment*, 994, 180053.

Schrauzer G. N. (2008). "Effects of selenium and low levels of lead on mammary tumor development and growth in MMTV-infected female mice". *Biological Trace Element Research*, 125(3), 268–275.

Sharma, G., & Chadha, P. (2024). "Toxic effects of aniline in liver, gills and kidney of freshwater fish *Channa punctatus* after acute exposure". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & pharmacology : CBP*, 281, 109916.

Shi, X., Wang, J., Lei, Y., Cong, C., Tan, D., & Zhou, X. (2019). "Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review) ". *Molecular Medicine Reports*, 19(6), 4529–4535.

Shree, A., Islam, J., Yadav, V., Sultana, S., & Khan, H. A. (2022). "Hesperetin alleviates DMH induced toxicity via suppressing oxidative stress and inflammation in the colon of Wistar rats". *Environmental Toxicology*, 37(9), 2153–2166.

Singhal, S. S., Godley, B. F., Chandra, A., Pandya, U., Jin, G. F., Saini, M. K., Awasthi, S., & Awasthi, Y. C. (1999). "Induction of glutathione S-transferase hGST 5.8 is an early

response to oxidative stress in RPE cells". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(11), 2652–2659.

Tahir, I., ve Alkheraije, K.A. (2023). "A review of important heavy metals toxicity with special emphasis on nephrotoxicity and its management in cattle." *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1149720.

Tan, B., Wikan, N., Lin, S., Thaklaewphan, P., Potikanond, S., & Nimlamool, W. (2024). "Inhibitory actions of oxyresveratrol on the PI3K/AKT signaling cascade in cervical cancer cells". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 170, 115982.

Teschke, R., & Xuan, T. D. (2022). "Heavy Metals, Halogenated Hydrocarbons, Phthalates, Glyphosate, Cordycepin, Alcohol, Drugs, and Herbs, Assessed for Liver Injury and Mechanistic Steps". *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, 27(11), 314.

Thakkar, H., Chatterjee, S., Verma, A., Chandrasekar, N., Khairnar, A., & Shah, R. P. (2025). "Malondialdehyde Mediated Alpha-Synuclein Aggregation: A Plausible Etiology of Parkinson's Disease in Oxidative Stress". *Chemical Research in Toxicology*, 38(4), 573–582.

Tian, C., Yu, M., Fang, Y., Zhao, Y., Fu, L., Chen, J., & Xia, D. (2025). "Therapeutic Effect of Smilax glabra Roxb. on Weaning Rats Against Pb-Induced Nephrotoxicity Based on Network Pharmacology". *Biological Trace Element Research*, 203(5), 2714–2727.

Tolou-Ghamari Z. (2025). "Biomarkers for Chronic Kidney Disease: An Updated Review of Innovative Detection Approaches". *Current Aging Science*, 10.2174/0118746098380113250707112707. Advance Online Publication.

Turgut, N. H., Kara, H., Elagoz, S., Deveci, K., Gungor, H., & Arslanbas, E. (2016). "The Protective Effect of Naringin against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Wistar Rats". *Pulmonary Medicine*, 2016, 7601393.

Turkington, R. E., Hukriede, N. A., Ho, J., Jayasundara, N., & Sanders, A. P. (2025). "Metal mechanisms of mitochondrial toxicity: recent review of arsenic, cadmium, and lead-induced nephrotoxicity". *Environmental Science and Pollution Research International*, 32(24), 14439–14451.

Türk, A., Kuloğlu, T., Zencirci, B., Gürel, A., et al. (2023). "Effects of 3-Benzoyl-7-Hydroxy Coumarin Compound on TNF- $\alpha$  and Caspase-3 Immunoreactivity in Kidneys of Rats Exposed to Aluminum". *Commagene Journal of Biology*, 7(1), 73-78.

Tyagi, A., & Aeddula, N. R. (2023). "Azotemia. In StatPearls". StatPearls Publishing.

Valenzuela-Chavira, I., Corona-Martinez, D. O., Garcia-Orozco, K. D., Beltran-Torres, M., Sanchez-Lopez, F., Arvizu-Flores, A. A., Sugich-Miranda, R., Lopez-Zavala, A. A., Robles-Zepeda, R. E., Islas-Osuna, M. A., Ochoa-Leyva, A., Toney, M. D., Serrano-Posada, H., & Sotelo-Mundo, R. R. (2021). "A Novel Glutathione S-Transferase Gtt2

Class (VpGSTT2) Is Found in the Genome of the AHPND/EMS *Vibrio parahaemolyticus* Shrimp Pathogen". *Toxins*, 13(9), 664.

Valivand, N., Aravand, S., Lotfi, H., Esfahani, A. J., Ahmadpour-Yazdi, H., & Gheibi, N. (2024). "Propolis: a natural compound with potential as an adjuvant in cancer therapy - a review of signaling pathways". *Molecular Biology Reports*, 51(1), 931.

Verma, S., Singh, P., Khurana, S., Ganguly, N. K., Kukreti, R., Saso, L., Rana, D. S., Taneja, V., & Bhargava, V. (2021). "Implications of oxidative stress in chronic kidney disease: a review on current concepts and therapies". *Kidney Research and Clinical Practice*, 40(2), 183–193.

Vieira, R. S. F., Venâncio, C. A. S., & Félix, L. M. (2021). "Embryonic zebrafish response to a commercial formulation of azoxystrobin at environmental concentrations". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111920.

Vinarov, Z., Müllertz, A., Mircheva, H., Gouar, Y. L., Menard, O., Kumar, S. P., Paudel, A., Dupont, D., & Augustijns, P. (2025). "Intraluminal enzymatic hydrolysis of API and lipid or polymeric excipients". *International Journal of Pharmaceutics*, 675, 125489.

Vukelić, D., Djordjevic, A. B., Anđelković, M., Antonijević Miljaković, E., Baralić, K., Živančević, K., Bulat, P., Radovanović, J., Đukić-Ćosić, D., Antonijević, B., & Bulat, Z. (2023). "Subacute Exposure to Low Pb Doses Promotes Oxidative Stress in the Kidneys and Copper Disturbances in the Liver of Male Rats". *Toxics*, 11(3), 256.

Wang, L., Su, Z., Ma, D., Qin, Y., Xiao, Y., & Zhang, X. (2025). "A Mitochondria-Targeted Dye for Investigating Mo Mineral Powder Induced Cytotoxicity through SIM Super-Resolution Imaging". *ACS Applied Materials & Interfaces*, 17(16), 23753–23762.

Widmaier, E. P., Raff, H. ve Strang, K. T. (2010). "Vander İnsan Fizyolojisi. (Çev.: Serdar Demirgören) ". İzmir: Güven Bilimsel. (2013)

Xiang, C., Ding, Q., Jiang, T., Hu, X. R., Jia, J., Xiang, J., Shi, S., Yang, X., Zhou, L., Mo, S., Wang, K. N., & Gong, P. (2025). "Ratiometric Red-Emitting Probe with Large Stokes Shift and AIE/ESIPT Characteristics for Acetylcholinesterase Imaging". *Analytical Chemistry*, 97(19), 10139–10144.

Xie, W., Chen, H. G., Chen, R. H., Zhao, C., Gong, X. J., & Zhou, X. (2024). "Intervention effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on lead-induced kidney injury mice and its mechanism: A study based on the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway". *Journal of Ethnopharmacology*, 319(Pt 2), 117197.

Xue, X., Wang, M., Cui, J., Yang, M., Ma, L., Kang, R., Tang, D., & Wang, J. (2025). "Glutathione metabolism in ferroptosis and cancer therapy". *Cancer Letters*, 621, 217697.

Yaman, T., Akkoyun, H. T., Bayramoğlu Akkoyun, M., Karagözoğlu, F., Melek, Ş., Keleş, Ö. F., & Bengü, A. Ş. (2025). "Assessment of the effect of sodium tetraborate on

oxidative stress, inflammation, and apoptosis in lead-induced nephrotoxicity”. *Drug and Chemical Toxicology*, 48(1), 150–162.

Yang, Y., Liu, M., Dong, X., Bai, J., Shi, W., Zhu, Q., Liu, J., Wang, Z., Yi, L., Yin, X., Ni, J., & Qu, C. (2025). “Naringin Suppresses CoCl<sub>2</sub>-Induced Ferroptosis in ARPE-19 Cells”. *Antioxidants*, 14(2), 236.

Yao, P. H., Mobarak, S. H., Yang, M. F., & Hu, C. X. (2025). “Differential detoxification enzyme profiles in C-corn strain and R-rice strain of *Spodoptera frugiperda* by comparative genomic analysis: insights into host adaptation”. *BMC Genomics*, 26(1), 14.

Zhang, L., Jing, P., Geng, B., Shi, J., Zhang, J., Liang, D., Yang, Y., Qu, Y., & Huang, J. (2025a). “Effect of glutathione reductase on photosystem II characterization and reactive oxygen species metabolism in cotton cytoplasmic male sterile line Jin A”. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 121(2), e17217.

Zhang, P., Zhang, N., Hu, Y., Deng, X., Zhu, M., Lai, C., Zeng, W., & Ke, M. (2025b). “Role of PI3K/AKT/MAOA in glucocorticoid-induced oxidative stress and associated premature senescence of the trabecular meshwork”. *Aging Cell*, 24(4), e14452.

Zhang, Y., Chang, J., Gao, H., Qu, X., Zhai, J., Tao, L., Sun, J., & Song, Y. (2021). “Huaqihuang (HQH) granule alleviates cyclophosphamide-induced nephrotoxicity via suppressing the MAPK/NF-κB pathway and NLRP3 inflammasome activation”. *Pharmaceutical Biology*, 59(1), 1425–1431.

Zheng, H., Ou, J., Han, H., Lu, Q., & Shen, Y. (2025). “SS-31@Fer-1 Alleviates ferroptosis in hypoxia/reoxygenation cardiomyocytes via mitochondrial targeting”. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 183, 117832.

Zhou, Y., Gu, C., Zhu, Y., Zhu, Y., Chen, Y., Shi, L., Yang, Y., Lu, X., & Pang, H. (2024). “Pharmacological effects and the related mechanism of scutellarin on inflammation-related diseases: a review”. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1463140.

Zhuang, W. B., Li, Y. H., Shu, X. C., Pu, Y. T., Wang, X. J., Wang, T., & Wang, Z. (2023). “The Classification, Molecular Structure and Biological Biosynthesis of Flavonoids, and Their Roles in Biotic and Abiotic Stresses”. *Molecules*, 28(8), 3599.

**EK-2:** Sıçanların böbrek dokularından elde edilen RNA örneklerinin 260/280 nm dalga boylarındaki absorbens değerleri ile reaksiyonda kullanılacak RNA hacmi ve RNAase free miktarları

| GRUP                     | Hayvan Sayısı | Konsantrasyon (ng/μL) | A260/280 Absorbans Değeri | Alınacak RNA hacmi (μL) | Sentezde eklenecek RNAase free miktarı |
|--------------------------|---------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------------------|
| Kontrol                  | B1            | 2392,5                | 1.633                     | 1,044932079             | 13,15506792                            |
|                          | B2            | 2401,67               | 1.606                     | 1,040942344             | 13,15905766                            |
|                          | B3            | 2527,61               | 1.486                     | 0,989076638             | 13,21092336                            |
|                          | B4            | 2482,62               | 1.525                     | 1,007000669             | 13,19299933                            |
|                          | B5            | 2494,71               | 1.519                     | 1,002120487             | 13,19787951                            |
|                          | B6            | 2482,62               | 1.536                     | 1,007000669             | 13,19299933                            |
|                          | B7            | 2515,04               | 1.492                     | 0,994019976             | 13,20598002                            |
| Naringin                 | B8            | 2562,59               | 1.429                     | 0,975575492             | 13,22442451                            |
|                          | B9            | 2528,84               | 1.487                     | 0,988595562             | 13,21140444                            |
|                          | B10           | 2480,66               | 1.533                     | 1,007796312             | 13,19220369                            |
|                          | B11           | 2513,94               | 1.491                     | 0,994454919             | 13,20554508                            |
|                          | B12           | 2439,02               | 1.582                     | 1,025001845             | 13,17499815                            |
|                          | B13           | 2502,41               | 1.521                     | 0,999036928             | 13,20096307                            |
|                          | B14           | 2609,72               | 1.425                     | 0,957957175             | 13,24204282                            |
| Kurşun Asetat            | B15           | 2480,63               | 1.53                      | 1,0078085               | 13,1921915                             |
|                          | B16           | 2477,97               | 1.527                     | 1,008890342             | 13,19110966                            |
|                          | B17           | 2424,31               | 1.591                     | 1,031221255             | 13,16877875                            |
|                          | B18           | 2411,73               | 1.596                     | 1,036600283             | 13,16339972                            |
|                          | B19           | 2537,59               | 1.469                     | 0,985186732             | 13,21481327                            |
|                          | B20           | 2469,38               | 1.533                     | 1,012399874             | 13,18760013                            |
|                          | B21           | 2295,31               | 1.717                     | 1,089177497             | 13,1108225                             |
| Kurşun Asetat + Naringin | B22           | 2335,44               | 1.672                     | 1,070462097             | 13,1295379                             |
|                          | B23           | 2322,87               | 1.688                     | 1,076254805             | 13,12374519                            |
|                          | B24           | 2443,09               | 1.567                     | 1,023294271             | 13,17670573                            |
|                          | B25           | 2359,23               | 1.662                     | 1,059667773             | 13,14033223                            |
|                          | B26           | 2434,99               | 1.587                     | 1,026698262             | 13,17330174                            |
|                          | B27           | 2271,08               | 1.744                     | 1,100797858             | 13,09920214                            |
|                          | B28           | 2223,78               | 1.777                     | 1,124211927             | 13,07578807                            |