

**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARINA KARŞI NARİNGİN VE SİLYMARİN'İN
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

Fizyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mustafa GÜL

Ortak Danışman

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Doktora Tezi - 2013

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA
KARŞI NARİNGİN VE SİLYMARİN'İN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

**Fizyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa GÜL**

**Ortak Danışman
Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN**

**ERZURUM
2013**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN ALT
EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA KARŞI
NARİNGİN VE SİLYMARİN'İN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

Tez Savunma Tarihi : 25.07.2013

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Mustafa GÜL (Atatürk Üniversitesi)

Ortak Danışman : Prof.Dr. İlhami GÜLÇİN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Şenol DANE (Turgut Özal Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Ali ÇINAR (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Tuncer NACAR (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. M. Erdem SAĞSÖZ (Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

**Doktora Tezi
ERZURUM - 2013**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İskemi.....	4
2.2. Reperfüzyon.....	6
2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı	7
2.4. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi	9
2.5. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Lökositlerin Rolü	15
2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikallerin Rolü	17
2.7. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Kompleman Sistemin Rolü	21
2.8. Antioksidanlar.....	24
2.8.1. Antioksidan Enzimler	27
2.9. Oksidatif Stres.....	31
2.6. Naringin	32
2.11. Silymarin.....	35
3. MATERYAL VE METOT.....	40
3.1. Naringin ve Silymarin'in Hazırlanması ve Uygulanması.....	41
3.2. Grupların Oluşturulması	42
3.3. Deney Modelimizin Oluşturulması.....	45

3.3.1. Kontrol Modeli	45
3.3.2. İskemi-Reperfüzyon Modeli	45
3.4. Sakrifikasyon	47
3.5. Biyokimyasal Prosedür	47
3.5.1. Dokuların Hazırlanması	47
3.5.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Ölçümü	48
3.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Ölçümü	48
3.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	48
3.5.4. Tiyobarbitürük Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini	49
3.5.5. Protein Tayini	49
3.5.6. Kreatin Kinaz (CK) ve Laktat Dehidrogenaz (LDH) Enzim Düzeylerinin Ölçümü.....	49
3.6. Histopatolojik İnceleme	49
3.7. İstatistiksel Analiz.....	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Sol Alt Ekstremitte Gastrokinemius Kası Biyokimyasal Parametreler	53
4.1.1. Malondialdehit (MDA).....	53
4.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)	54
4.1.3. Katalaz (CAT).....	55
4.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	56
4.2. Serum Biyokimyasal Parametreler	57
4.2.1. Kreatin Kinaz (CK).....	57
4.2.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH).....	58
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	59
4.3.1. Kontrol Grubu Bulguları.....	59

4.3.2. İskemi/Reperfüzyon Grubu Bulguları	61
4.3.3. İskemi/Reperfüzyon ve Naringin Grubu Bulguları	63
4.3.4. İskemi/Reperfüzyon ve Silymarin Grubu Bulguları	65
4.3.5. İskemi/Reperfüzyon ve Naringin ve Silymarin Grubu Bulguları	67
4.3.6. Gastrokinemius Kası Lökosit İnfiltrasyonu	69
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR	82
EKLER	105
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	105
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	105

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca, tez konumda çalışmamı sağlayan, önümde yeni ufuklar açan, geniş tecrübesiyle çalışmalarımnda etkin katkısı bulunan, beni yönlendiren ve rehberlik eden, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜL'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

İkinci danışmanlığımı üstlenerek, değerli bilgileriyle bana ışık tutan, her konuda yardımcı ve yol gösterici olan, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca tezimin histopatolojik çalışma bölümünün yapılmasında yardımları ile katkı sağlayan Sayın Yrd. Doç. Dr. İsmail CAN'a şükranlarımı sunarım. Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Tuncer NACAR'a teşekkür ederim. Doktora tez çalışmam sırasında desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Cebail GÜRSUL'a teşekkür ederim. Bu tez çalışmasını **2011/281** BAP numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne teşekkür ederim.

Bugüne gelebilmemin yegane sebebi, eğitim ve öğrenim yaşamım boyunca daima kendilerinden görmüş olduğum maddi ve manevi destek, güven ve sevgiden ötürü çok kıymetli anneme, babama ve kardeşlerime, doktora öğrenimim süresi boyunca bana her konuda madi ve manevi destek olan eşim Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ocak AKDEMİR'e sonsuz şükranlarımı sunarım.

Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR

ÖZET

Sıçanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarına Karşı Naringin ve Silymarin'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmanın amacı alt ekstremitte İ/R hasarına karşı Naringin ve Silymarin'in koruyucu etkilerini araştırmaktır.

Materyal ve Metot: 40 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat, rastgele ve eşit sayıda olmak üzere beş gruba ayrıldı. Kontrol grubu tam standarizasyon amacıyla 4 saat anestezi altında uyutuldu. İ/R grubun da 2 saat iskemi-2 saat reperfüzyon uygulandı. İ/R+NAR grubunda, naringin 3 kez 8 saat ara ile 400 mg/kg dozda intragastrik olarak uygulandı takibinde 2 saat iskemi-2 saat reperfüzyon uygulandı. İ/R+SİL grubunda, silymarin 3 kez 8 saat ara ile 200 mg/kg dozda intragastrik olarak uygulandı takibinde 2 saat iskemi-2 saat reperfüzyon uygulandı. İ/R+NAR+SİL grubunda aynı dozlarda Naringin ve Silymarin intragastrik olarak uygulandı takibinde 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon gerçekleştirildi. Reperfüzyon tamamlanmasıyla ratlar; kanda CK ve LDH düzeyleri ve kas dokusunda MDA, SOD, CAT, GSH-Px düzeyleri ölçmek üzere örnekleri alınıp sakrifiye edildi.

Bulgular: İ/R grubu gastrokinemius kası MDA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı görüldü. Naringin ve Silymarin'in MDA düzeyini anlamlı derecede düşürdüğü tespit edildi. İ/R grubunda SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde kontrole göre anlamlı bir azalma olduğu, Naringin ve Silymarin uygulamasının bu azalmayı önleyerek enzim aktivitelerini anlamlı derecede yükselttiği görüldü. Ayrıca alt ekstremitte İ/R hasarında yoğun lökosit infiltrasyonu ile belirgin histopatolojik değişiklikler görülmüştür.

Sonuç: Deneysel alt ekstremitte İ/R modelimizde, Naringin ve Silymarinin sistemik olarak ve kasta oluşan lokal hasarı engellemede koruyucu etkiye sahip oldukları görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İ/R Hasarı, İskelet kası, Naringin, Silymarin

ABSTRACT

The Investigation of the Preventive Effects of Naringin and Silymarin on Experimental Ischemia-Reperfusion Injury in Hindlimb of Rats

Aim: The aim of this study was to investigate the protective effects of Naringin and Silymarin against hindlimb I/R injury.

Materials and Methods: 40 male rats (Sprague-Dawley) were randomly divided into five equal groups. 2 hours ischemia-2 hours reperfusion was performed in the I/R group. Naringin (400 mg/kg dose, 3 times with 8 h intervals) was administered by intragastric way to the I/R+NAR group before 2 hours ischemia-2 hours reperfusion. Silymarin (200 mg/kg dose, 3 times with 8 h intervals) was administered by intragastric to the I/R+SIL group before 2 hours ischemia-2 hours reperfusion. Naringin and silymarin in the same doses were given by intragastric way to the I/R+NAR+SIL group before 2 hours ischemia-2 hours reperfusion. The control group were put to sleep under anesthesia for 4 hours to complete standardization. By the completion of reperfusion; rats were sacrificed after taking samples to measure levels of CK and LDH in the blood and levels of MDA, SOD, CAT and GSH-Px in muscle tissue.

Results: The gastrocnemius muscle MDA level in I/R group was significantly higher than the control group. MDA levels were significantly decreased by Silymarin and Naringin. A significant reduction was found in muscle SOD, CAT and GSH-Px enzyme activities in I/R group compared with control group. These reductions were prevented by Silymarin and Naringin. Additionally evident histopathological changes were observed in hindlimb I/R injury with intense infiltration of leukocytes.

Conclusion: In the experimental hindlimb I/R model, it was seen that Naringin and Silymarin have protective effect in preventing systemic and also local effects of the I/R injury in muscle.

Key Words: I/R Injury, Naringin, Silymarin, Skeletal muscle

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	: Adenozin Tri Fosfat
Ca²⁺	: Kalsyum İyonu
CAT	: Katalaz
CK	: Kreatin Kinaz
GAPDH	: Glyceraldehyde-3- Fosfat dehydrogenase
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
İ/R	: İskemi/Reperfüzyon
İL-1	: İnterlökin-1
İL-3	: İnterlökin-3
K⁺	: Potasyum İyonu
KDH	: Ksantin Dehidrogenaz
KO	: Ksantin Oksidaz
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LOOH	: Lipit Hidroperoksitleri
MDA	: Malondialdehit
Na⁺	: Sodyum İyonu
NADP⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid (indirgenmiş form)
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotidin (yükseltgenmiş form)
NAR	: Naringin
OH[•]	: Hidroksil Radikali
O₂	: Oksijen molekülü
¹O₂	: Singlet Oksijen
O₂^{•-}	: Süperoksit anyon radikali

PMNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
SİL	: Silymarin
SKS	: Sodyum Karboksimetil Selüloz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Hücre hasarında sitoplazmik Ca^{2+} artışının kaynakları ve sonuçları.....	13
Şekil 2.2. İskemide membran hasarının mekanizmaları.....	13
Şekil 2.3. İskemide pürin metabolizmasının gelişimi ve KDH'nin KO'a transformasyonu, reperfüzyon ile beraber doku hasarı gelişimi.	15
Şekil 2.4. Oksidatif Stres Mekanizması.....	32
Şekil 2.5. Flavonoid molekülünün genel yapısı.	33
Şekil 2.6. Naringin ve aktif metaboliti naringenin kimyasal yapısı.	34
Şekil 2.7. Silymarinin kimyasal formülü.....	36
Şekil 2.8. Silymarin yapısal komponentleri,silbin,silidiyanin ve silikristin kimyasal formülü.....	36
Şekil 3.1. Ratlara gavaj ile ilaç uygulaması.....	42
Şekil 3.2. K Grubu ratların tam standardizasyon sağlanabilmesi için anestezi altında uyutulması.....	43
Şekil 3.3. İ/R modeli oluşturulan ratların anestezi altında uyutulması.....	44
Şekil 3.4. İ/R modelini oluşturmak için anestezi altında sol ekstremitte olabildiğince proksimalinden bir turnike yardımıyla femoral arter ve kollateralleri oklüze edilerek tek taraflı alt ekstremitte iskemisi oluşturulması.	46
Şekil 3.5. İskemi uygulanan sol alt ekstremitedeki renk değişimi (morarma) ve şişlik.	47
Şekil 4.1. MDA düzeyleri.....	53
Şekil 4.2. SOD düzeyleri.	54
Şekil 4.3. CAT düzeyleri	55
Şekil 4.4. GSH-Px düzeyleri.....	56
Şekil 4.5. CK düzeyleri.....	57

Şekil 4.6. LDH düzeyleri.....	58
Şekil 4.7. K grubuna ait deneklerin gastrokinemiyus kası ışık mikroskopik görünümleri.....	60
Şekil 4.8. İ/R grubuna ait deneklerin gastrokinemiyus kası ışık mikroskopik görünümleri.....	62
Şekil 4.9. İ/R grubuna ait deneklerin gastrokinemiyus kası ışık mikroskopik görünümleri.....	63
Şekil 4.10. İ/R+NAR grubuna ait deneklerin gastroknemiyus kası ışık mikroskopik görünümleri.....	64
Şekil 4.11. İ/R+SİL grubuna ait deneklerin gastroknemiyus kası ışık mikroskopik görünümleri.....	66
Şekil 4.12. İ/R+SİL+NAR grubuna ait deneklerin gastroknemiyus kası ışık mikroskopik görünümleri.....	68
Şekil 4.13. Sıçanların soleus kasındaki lökosit infiltrasyonu (ortalama lökosit sayıları).	69

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. Gruplara ait MDA düzeyleri.	53
Tablo 4.2. Gruplara ait SOD düzeyleri.	54
Tablo 4.3. Gruplara ait CAT düzeyleri.	55
Tablo 4.4. Gruplara ait GSH-Px düzeyleri.	56
Tablo 4.5. Gruplara ait CK düzeyleri.	57
Tablo 4.6. Gruplara ait LDH düzeyleri.	58
Tablo 4.7. Sıçanların gastrokinemiyus kası lökosit infiltrasyonu istatistik sonuçları.	69
Tablo 4.8. Rat gastroknemiyus kası için histopatolojik değerlendirme skoru.	70

1. GİRİŞ

İskemi ve reperfüzyon (İ/R) hasarı, enfeksiyon veya kanser gibi çok sayıda klinik durumu ilgilendiren; klinik veya moleküler düzeyde pek çok basamağı tam olarak aydınlatılmamış geniş fizyopatolojik bir süreçtir. Akut ya da kronik dolaşım bozuklukları, organ perfüzyonlarının etkilendiği klinik durumlar, flep cerrahisi sonrası iskemik sorunlar, damar yaralanmalı kırıklar, turnike süresinin uzadığı cerrahi girişimler ile kompartman sendromu ekstremitayı iskemiye maruz bırakabilmektedir. İ/R hasarı oldukça karmaşık, hücresel ve humoral olaylar dizisidir. İskemiye maruz kalan dokuda başlayan çok sayıda kimyasal reaksiyon sonucunda hücresel enerji depolarının tükenmesi ve toksik metabolitlerin birikmesine bağlı olarak hücresel disfonksiyon ve nekroz gelişir. İskemik dokuda hücrelerin rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenebilmesi için yeniden kan akımının başlaması gerekir. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak hasarın artışına neden olur. Reperfüzyon sürecinde başlamış reaksiyonların sitotoksik oksidanlar ile ilişkili olması nedeniyle, bu süreçte meydana gelen hasarın yalnızca iskemi döneminde oluşan hasara göre çok daha ciddi olduğu bildirilmiştir.¹

Akut ekstremita iskemisi kollateral damarların gelişmiş olduğu kronik ateroskleroz durumunda bile oldukça ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilen klinik bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Akut iskemiye yol açan durum ortadan kaldırılıp reperfüzyon sağlanabilse dahi mortalite ve morbidite riski devam etmektedir. Ve dahası cerrahi müdahalenin geciktiği vakalarda bu riskler giderek artış göstererek öne çıkmaktadır.² Ekstremita reperfüzyonu tam olarak sağlanması halinde bile ekstremita kaybına ve uzak organ hasarı (akut böbrek ve solunum yetmezliğine, kalp, barsak, beyin ve dalak gibi) ile birçok dokuda fonksiyon

bozukluğuna yol açacak olaylar zinciri başlar.³ Akut ekstremite iskemisinin cerrahi olarak ortadan kaldırılması ile ilgili tekniklerdeki ilerlemelere rağmen bu istenmeyen olaylardan tamamıyla kurtulmak mümkün olmamıştır ve bu konuda yapılan çalışmalar devam etmektedir.⁴ Doğaldır ki bu durumu önlemeye yönelik uygulama metodu ve ilaçların bulunması için öncelikle bu olayı başlatan, sebep olan durumları ve olayların gelişiminin değerlendirilmesi gerekmektedir. İ/R ile ilgili yapılan çok sayıda çalışmada reperfüzyon hasarı olarak isimlendirilen %30-50 dolayında ekstremite kaybına %30-80 gibi değişen ve yüksek oranlarda mortaliteye yol açan bu olayda iskemi sonrası Ca^{2+} birikimi, asidoz, enerji depolarının tükenmesi ve bu olaylar sonrası oksijen (O_2) ile yeniden buluşma döneminde oluşan serbest oksijen radikallerinin (SOR) başlattığı, hücre ölümü ile sonuçlanan nötrofil aktivasyonunun rol oynadığı belirtilmiştir.⁵ Antioksidan maddelerin kullanımı ile reperfüzyon sürecindeki bu istenmeyen hasarı önlemeye dönük çalışmalar devam etmektedir. Bu amaçla, desferioksamin, C ve E vitamini, allopurinol, süperoksit dismutaz, mannitol gibi maddeler üzerinde çalışmalar yapılmıştır.^{6,7}

Birçok cerrahi dalın başvurduğu bir yöntem olan turnike kullanımı, bir İ/R modelidir. Kanserli bir ortam sağlayarak girişimin kolaylaştırılması ve hızlandırılması, kan kaybını azaltarak transfüzyon gereksinimini sınırlaması ve operasyon süresini kısaltması turnike kullanımının avantajları arasında sayılabilir.⁸

İ/R hasarının doku ve organ hasarı üzerindeki etkisi ve klinik önemi bilinmekte ve bu konuda pek çok araştırma yürütölmektedir. Gerek deneysel, gerekse klinik zeminde yapılan çalışmalarda reperfüzyon hasarını azaltmaya veya önlemeye yönelik sayısız ajan araştırılmıştır. Bu ajanların etkinliğinin belirlenmesi kimi zaman yalnızca deneysel aşamada kalmış nadiren uygulama alanı bulmuştur. Amacın akut iskemi sonrası reperfüzyon hasarını en aza indirmek olduğu

düşünümlerek biz de çalışmamızda antioksidan kapasiteye sahip birer ajan olan naringin ve silymarin'in akut ekstremite iskemisinde rolünü ve SOR ile başlayan olayların önemli enzimleri olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), kreatin kinaz (CK), laktat dehidrojenaz (LDH) ve lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeylerinin iskelet kasında ölçülmesi ile olası doku tedavi edici etkilerini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Çizgili kas İ/R hasarı klinikte periferik arter hastalıkları cerrahisinde aort klemplenmesi, tromboembolik oklüzyon sonrası sağlanan reperfüzyon, arter greftleme operasyonları, ekstremitre replantasyonları, ezilme yaralanmaları ve bazı ortopedi ameliyatlarında uygulanan turnike iskemisi şeklinde görülür. Bu patolojik olayın ortaya çıkmasından sorumlu olabilecek bir dizi mekanizma söz konusudur: SOR, proinflamatuvar medyatörler, lökosit infiltrasyonu, Ca^{2+} yüklenmesi, fosfolipid peroksidasyonu ve fosfolipid azalması, bozulmuş nitrik oksit metabolizması ve azalmış ATP sentezidir.⁹ İ/R hasarı karaciğer, kalp, kas, böbrek, akciğer ve barsaklarda sık rastlanılan ve ciddi patolojilere yol açabilen olaylar kompleksidir. Hangi organda olursa olsun İ/R sistemik enflamatuvar bir yanıt oluşturur, iskelet kasında olduğunda ekstremitede işlev kaybı ve amputasyonla sonuçlanabilir.^{10, 11} Hatta kardiyovasküler sistem, respiratuvar, hepatik ve renal disfonksiyonlara bağlı ölüm görülebilir.¹² İ/R hasarını açıklayabilmek amacıyla çok sayıda hipotez ileri sürülmüştür. Bunlar arasında en kabul gören mekanizma reperfüzyon anında ksantin oksidazdan (KO) üretilen SOR'lardır. Oksidatif stresi azaltmak amacıyla vücutta geliştirilen mekanizmalar arasında CAT ve glutatyon (GSH) sistemleri sayılabilir, ayrıca iskemi ya da reperfüzyon aşamalarında birçok ajan kullanılmıştır.¹³

2.1. İskemi

Dokulara kan sağlayan damarların, pıhtı veya mekanik bir nedenle tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin engellenmesi ve metabolizmasının bozulması durumuna iskemi denir. Bir dokunun kanlanması kesildiğinde ilgili dokuya ait hücrelerin işlev bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen çok sayıda kompleks bir dizi kimyasal reaksiyon gerçekleşir. Hücresel fonksiyonların devamlılığının sağlanabilmesi için gıda maddelerini O_2 ile yakılması gerekmektedir. Normal hücre fonksiyonları için

gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma yoluyla sağlanır. O₂ yokluğu durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik asit ve toksik metabolitler gibi çeşitli ürünlerin birikimi ile sonuçlanır. Oluşan asidoz sebebiyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi devamlılığı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır.¹⁴⁻¹⁶

Dokuların iskemiye dayanabilirlikleri ve bununla ilgili olarak kritik iskemi süreleri birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabilmesine rağmen sinir hücrelerinde dakikalar içinde geri dönüşümsüz hasarlar ortaya çıkabilir.¹⁴⁻

¹⁷ Bunun yanında deri ve kemik dokuları, İ/R'ye iskelet kası ve intestinal mukozaya göre daha dayanıklıdır. Kritik iskemi süresi, bir dokunun tolare edebildiği ve canlılığını devam ettirdiği maksimum zaman aralığıdır. Kritik iskemi süresi, doku türüne ve sıcaklığa bağlı olarak değişir.¹⁸ Yine bu süre organa göre değişir. Karaciğer ve böbrekte 10-15 dakika, iskelet kasında 2.5 saattir. Bunun yanında bu süre beyinde 5 dakikadan daha azdır. Bu sürenin uzaması büyük nöronal ölümlere ve enfarktüse neden olur. Kritik iskemi süresinin aşılmasından sonra gerçekleşen reperfüzyon endotelial ve parenkimal hasar ile sonuçlanır.¹⁹ Kritik iskemi süresi, dokunun tam iskemiye tolare edebildiği maksimum zaman uzunluğunu ifade eder ve dolaşım onarıldığında canlılık devam eder. Ortalama kritik iskemi süresi, uygulama yapılan yerlerin %50'sinin ölmesine neden olan iskemi periyodudur. Kritik iskeminin süresi, farklı doku tiplerine göre değişir. Arterlerde ve rastgele deri uygulamalarında 13 saat civarındadır. Bununla birlikte, ortalama sekonder kritik iskemi süresi 7 saat civarında iken bu uygulamaların güvenilir sekonder kritik iskemi süresi sadece 4.7 saattir.²⁰

Hangi organda olursa olsun İ/R sistemik enflamatuar bir yanıt oluşturur.^{20, 21} Hücrel homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP'nin tükenmesi, hücre membranında iyon dengesinin bozulmasına neden olur. Na⁺ ve Ca²⁺ iyon dengesi

bozulur. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik göstergeler ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder.¹⁴⁻¹⁷

2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskekiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak iskeki sırasında engellenen kan akımının yeniden normale dönmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi olumlu iki etkisi vardır. Yani reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için mutlaka gerekli bir süreçtir. İskemik dokuda veya organda kan akımı normale dönebilse dahi iskemik doku/organ, fonksiyonlarını kısmen geri kazanır böylece oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuda daha fazla hasar oluşturan bir reaksiyon sürecini başlatır.^{1, 16, 22} Reperfüzyon hasarı SOR, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Süper oksit ($O_2^{\bullet-}$) anyonu, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) en iyi bilinen SOR türleridir. Bu ürünlerin oluşumunda difosfonükleotid (NADPH) sistemi ile KO sistemi etkin rol oynamaktadır.²³ Sonuçta dokularda iskemik süreçten çok daha ciddi bir hasar meydana gelir. Hasarı asıl tetikleyen durum olarak ise endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir.^{16,17, 20-25} İskemi sonrası dönemde, iskemik dokudaki serbest radikallerin en önemli kaynağı KO enzimidir. Bu enzim “dehidrogenaz” ve “oksidaz” aktivitesine sahip iki şekilde bulunur. Çalışmalarda iskeki sırasında ksantin dehidrogenaz (KDH) enziminin Ca^{2+} aracılı bir proteaz katalizörlüğünde KO’a, intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dakika sürmektedir. Bu da değişik dokuların İ/R hasarına neden farklı oranlarda cevap verdiği konusunda açıklayıcı olmaktadır. Ayrıca hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar.^{14, 25, 26}

Ksantin Dehidrogenaz



Ksantin oksidaz



Sonuç olarak dokularda iskemik süreçten çok daha ağır bir hasar meydana gelir. Ayrıca reperfüzyon, organizmada istenmeyen birçok olayı harekete geçirdiği gibi kolon kanseri gibi kanser hücrelerinin metastazında da rol oynamaktadır.²⁷

2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

İ/R hasarı yetersiz O₂ sunumu ile başlayan, nötrofil ve SOR'ların rol aldığı ikincil enflamatuvar cevapla ilerleyen karmaşık patolojik bir süreçtir.^{8, 28-35} Dokuya giden kan akımı durduğu zaman hücresel fonksiyon bozukluğuna neden olan zincirleme kimyasal olaylar başlar. O₂'e bağımlı metabolizma normal hücre fonksiyonlarının devamı için normal şartlarda kullanılan yoldur. O₂ yokluğu ise aneorobik metabolizma ile sonuçlanır ve laktik asidin birikimi artar. Asidoz sonucunda hücrede normal enzim kinetikleri değişir, yüksek enerji bağları parçalanır ve hücre, hayati dengesini idame ettirebilmek için gerekli olan enerjiyi kaybeder.^{28, 36-38} Organizmanın iskemiye verdiği cevap, hücre/doku türü ve iskemi süresine bağlı olarak değişir. Örneğin insan kas dokusunda normal sıcaklıkta histolojik değişikliklerin başladığı iskemi süresi 2 saatten

başlarken, ince barsakta bu değişiklikler yaklaşık 30 dakikalık iskeminin ardından başlar.²⁸ Fizyolojik ve anatomik çalışmalarda kas dokusunda 3 saatlik iskemi sonrası geri dönüşümsüz hücresel hasarın başladığı ve 6. saatte neredeyse tamamlandığı gösterilmiştir.³⁶ Sonuç itibariyle iskemik hasarın derecesini gösteren iskemi alanının genişliği ve süresi iki önemli faktördür.

İskemik dokuya yeniden kan akımının sağlanmasıyla birlikte enerji temin edilir, hasar gören hücre onarılır ve toksik metabolitler ortamdan uzaklaştırılır. Reperfüzyon, iskemik hasarın düzelebilmesi için gerekli olmakla beraber, tehlikeli metabolik sonuçlara neden olur. İleri derece bölgesel doku hasarını başlatabilir ve toksik metabolitler sistemik dolaşıma geçip sistemik hasara yol açabilir. İ/R'nin yol açtığı doku hasarının büyük oranda reperfüzyon döneminde gerçekleştiğiyle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır.^{28, 39-41} Hasarlanmaya neden olan doku perfüzyonundaki bozulma, damar permeabilitesinin artışı ve sekonder gelişen doku ödemiyle ilişkilidir. Damar endotelini koruyan ve endotel fonksiyonlarını bozacak patolojik süreçleri hafifleten ajanlar ve yaklaşımlar hasarlanmaya karşı profilaktik etkinlik göstermişlerdir.^{36-38, 42}

Klinik çalışmalarda vasküler kan akımının yeniden sağlanmasından sonra, iskemik organa kan akımının tam olarak geri dönmediği gösterilmiştir. Fakat bu perfüzyon sorununun altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu duruma, damar lümeninde trombosit-lökosit birikimi, interstisyel sıvı birikimi (ödem), endotelial vazorelaksanların (nitrik oksit, prostasiklinler) azalması ve sonuç itibariyle mekanik olarak kan akımı azalmasını neden olduğu ileri sürülmektedir. Klinik açıdan infarkt sahasında artma, transplant greftinin reddi, postoperatif dönemde organ yetersizliğinde artış ile karşımıza çıkar. Söz konusu bu olay "*no-reflow fenomeni*" olarak adlandırılır. Bu fenomene neden olarak sıklıkla lökosit adezyonu üzerinde

durulmaktadır. Örneğin iskemi sonrası dokuda yeniden kan akımı oluşmayan kapillerlerin sayısı ile burayı infiltre eden lökosit sayısı arasında güçlü bir korelasyon vardır. Yapılan çalışmalarda nötrofillerin baskılanması ile miyokard, beyin ve iskelet kasında bu oluşumun azaltılabildiği gösterilmiştir. Ayrıca SOR oluşumu önlendiğinde, kapiller akımın onarıldığı ve lökosit/endotel hücre adezyonunun engellendiği de çok sayıda çalışma ile ortaya konulmuştur.^{31,37,43}

2.4. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

İskemi, organı veya dokuyu perfüze eden kan akımı yetersizliğine bağlı olarak metabolik ve yapısal değişiklikler ile gelişen geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku zedelenmesine neden olmaktadır.¹ İskemi sonrasında hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Bunlardan biri; iskeminin hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak hücre içi ATP (Adenozin 5'trifosfat) ve fosfokreatin sentezinde azalmaya yol açmasıdır. Bu durum hücre membranının ATP'ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu (Na^+/K^+ ATPaz pompası) bozarak hücreye daha fazla kalsiyum (Ca^{2+}), sodyum (Na^+) ve su (H_2O) girmesi ve potasyum (K^+) çıkışı ile sonuçlanmaktadır.⁴⁴ İntraselüler Ca^{2+} artışı hücre için sitotoksiktir.

Nitekim yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflamatuvar sitokinlerin, lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin aktivitesinde azalma olur. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar. İskemik dönemde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den adenozin monofosfat (AMP) ve adenozin oluşur. Adenozin, hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin

dehidrogenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu)'dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle $\text{KDH} \rightarrow \text{KO}$ 'a aktivasyonunda hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler O_2 kullanılır.⁴⁵ İskemi sonrasında o bölgedeki kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) ve hücre içine moleküler O_2 'nin yeniden taşınması ile birlikte SOR türevleri hızla oluşmaktadır.⁴⁶ (Şekil 2.2.)

İskemi sırasında hücrel oksidatif fosforilasyon azalır ve ilk basamakta mitokondrilerce gerçekleştirilen oksidatif fosforilasyon yolu ile üretilen ATP sentezi durur. ATP, hücrelerin kullandığı acil enerji kaynağıdır. Ayrıca ATP hücre zarından geçmediği için hücre dışına çıkamaz. Suda çözündüğü için depolanamaz. Hücre içinde ATP iki yolla üretilir:

1. Glikoliz yolu (Glikolitik yol): Anaerobik (oksijensiz) ortamda glukozun pirüvat üzerinden Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi ile laktik aside yıkılması olayıdır. Glukozdan bu şekilde 2 ATP'lik enerji sağlanır. Glikolizin amacı, organizmaya gerekli kimyasal enerjiyi O_2 ihtiyacı duymaksızın kısa yoldan sağlamaktır. Glikolizde, bir glukoz molekülü için edinilen toplam enerji, glukozun oksidasyonu yoluyla kazanılana göre çok daha azdır. Ancak O_2 'nin sınırlı olduğu durumlarda dokuların gereken enerjiyi bu yoldan sağlayabilmeleri bakımından oldukça önemlidir. İskemide hücreler tarafından kullanılan glukozun %80-90'ı sitoplazmada anaerobik olarak glikoliz yoluyla kullanılır.⁴⁷

2. Oksidatif fosforilasyon: Buna aerobik glikoliz de denilir. Anaerobik glikoliz yoluyla oluşan pirüvat ve laktat daha sonra mitokondriye taşınır. Burada aerobik glikoliz yoluyla yıkılmaya başlar. Anaerobik glikolizde pirüvat, yağ asitlerinin yıkılması

sonucu oluşan Asetil-CoA'lar ve pek çok aminoasit Krebs döngüsüne girip yıkılırlar ve organizmanın kullanılabilir enerjisi olan ATP'yi oluştururlar. Bu yolla 36-38 ATP elde edilir. Krebs döngüsü mitokondrilerde gerçekleşir. Glukozun O_2 ile yakılması sonucu oluşan ürünler 6 CO_2 , 6 H_2O , 38 ATP ve ortama serbestleşen ısıyı sağlayan enerjidir. Anaerobik glikoliz ile oluşan laktat ve pirüvat, glikolizin ileriki evrelerine aktarılamadığında hücre içinde birikirler. Aerobik glikoliz kesinlikle O_2 'li ortamda, O_2 kullanarak gerçekleşir. Mitokondrilerdeki O_2 yetersiz ise aerobik glikoliz gerçekleşemez böylelikle glukozdan enerji sağlanması aerobik glikoliz basamağında duraksar. Bu durum hücre ve organizma için istenmeyen bazı olumsuz sonuçlar doğurur. Glukoz tam olarak yıkılamaz, bununla birlikte elde edilen ATP miktarı azalır. Aerobik glikoliz yolu durunca hücre büyük oranda ATP kaybeder, çünkü glukoz sadece pirüvata kadar yıkılabilmiş, yani 38 ATP yerine sadece 2 ATP üretilebilmiştir. İskeminin ilk dakikalarında aşırı uyarılan glikolitik yol, ortamda sitrat, laktat, nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) birikimi ve doku asidozunun oluşması ile durur. İskemik dokuda bulunan O_2 ise oksidatif fosforilasyonu devam ettirebilmek için yetersiz kalır ve glikoliz sonucu oluşan piruvatın laktata dönüşümü gerçekleşir. Böylece glikojenden ATP oluşumu ile hücre enerji kaynakları korunur. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine neden olur. Sonuç olarak hücre içi pH düşer ve buna bağlı olarak asidoz gelişir.⁴⁷

ATP kaybı intraselüler çok sayıda ve birbiriyle ilişkili sistemi genel olarak aynı anda etkiler. Bunlar;⁴⁷

■ Na^+/K^+ ATPaz pompasının bozulması: Fizyolojik koşullarda hücreden 3 Na^+ iyonunun ekstraselüler ortama, 2 K^+ iyonunun intraselüler ortama iletilmesi işlemi bir ATP molekülünün ADP'ye yıkılmasıyla metabolik enerjinin harcanmasını gerektirmektedir. Özellikle hücrede ATP aktivitesinin azalması membranda aktif Na^+

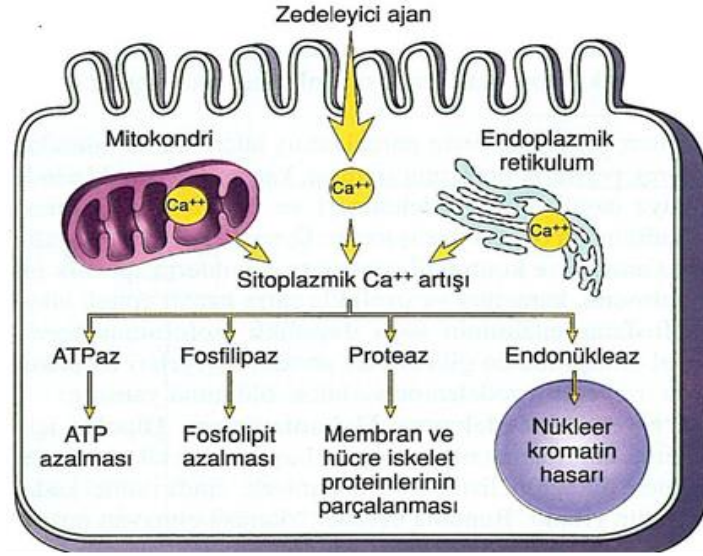
pompasının yetersizliğine yol açarak intraselüler Na^+ artışı ve hücreden K^+ dışarı atılımına neden olur. Solid materyalin birikimine izoozmotik su birikimi eşlik eder ve akut hücrel şişme oluşur.⁴⁷

■ İntraselüler asidoz oluşumu ve buna bağlı olarak pH'nın düşmesi: Doku O_2 düzeylerindeki azalma laktat birikimine neden olur ve doku pH'sı düşer.

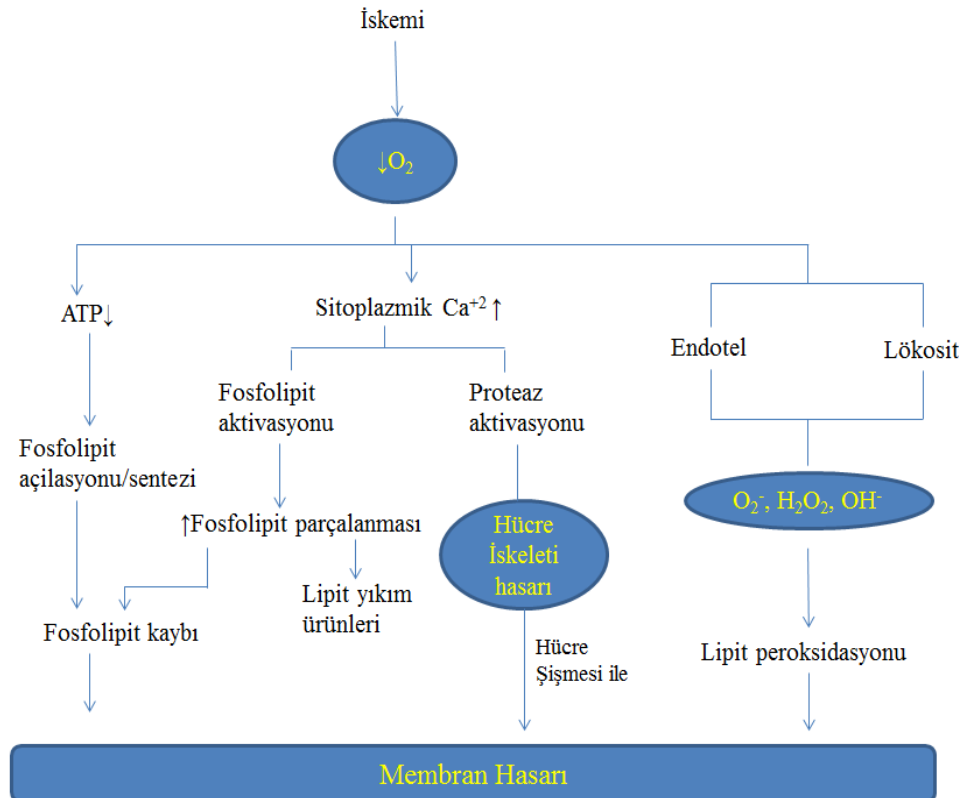
■ İntraselüler ortamda Ca^{2+} birikimi: Fizyolojik koşullarda sitozolik serbest Ca^{2+} ekstraselüler düzeyi ile karşılaştırıldığında intraselüler düzeyi düşük seviyelerde bulunur ve bununda çoğunluğu mikokondri ve endoplazmik retikulum içinde tutulur. Bu denge membran Ca^{2+} ATPaz pompası tarafından düzenlenir. İskemi veya belirli toksinler erken dönemde sitozolik Ca^{2+} seviyelerinde artış oluşturur, bu durum mikokondri ve endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımı ve plazma membranından net Ca^{2+} geçişi ile ilişkilidir. Hücrede Ca^{2+} artışı membran geçirgenliğinde nonspesifik artışla desteklenir. Artmış Ca^{2+} çok sayıda enzimin aktivasyonuna yol açar. Bunlar; fosfolipaz (membran hasarını başlatır), proteaz (membran ve hücre iskeleti proteinlerini parçalar), ATPaz (ATP'nin azalmasını hızlandırır) ve endonükleaz (kromatin parçalanması ile birliktedir) dir.⁴⁸ (Şekil 2.1.)

■ Pürin metabolitlerinin birikimi: İskemi süresi uzadıkça ATP yıkımı başlar, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitleri birikimi şekillenir. Hipoksi ve intraselüler Ca^{2+} artışı aynı zamanda KDH, KO'a aktivasyonuna yol açar. KDH, KO'a aktivasyonu Ca^{2+} bağımlı proteaz katalizörlüğünde gerçekleşir. Bu proteazların aktivasyonu; iskemi sırasında, tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin-1 (İL-1), interlökin-3 (İL-3), nötrofillerden salınan elastaz ve kompleman sistem aktivasyonu tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu arada endotelde bazı proinflamatuvar ürünlerin (lökosit adhezyon molekülleri ve sitokinler) ve biyoaktif ajanların (endotelin, tromboksan A_2) yapımı artarken, diğer bazı koruyucu ürünlerin (yapısal nitrikoksit

sentetaz, trombomodulin) ve biyoaktif ajanların (prostosiklin, NO) yapımı baskılanır⁴⁹. Böylece iskemi, daha sonraki reperfüzyon döneminde doku zedelenebilirliğini arttıran proinflatuar bir durumu başlatır.⁴⁸



Sekil 2.1. Hücre hasarında sitoplazmik Ca^{2+} artışının kaynakları ve sonuçları.⁴⁷



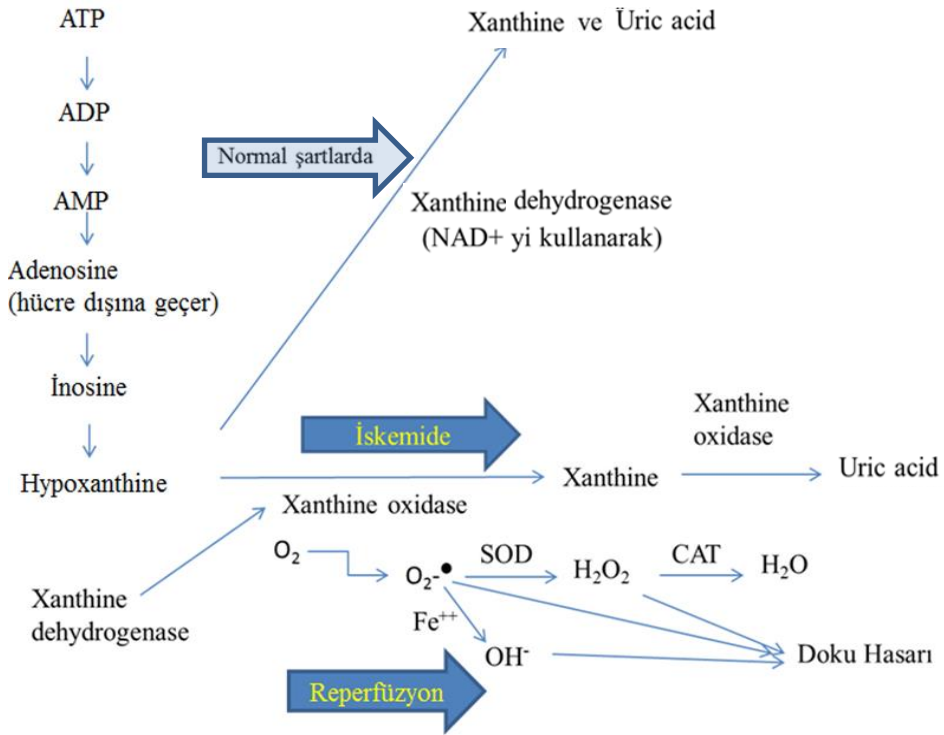
Şekil 2.2. İskemide membran hasarının mekanizmaları.⁴⁷

Membran hasarının birçok potansiyel nedeni vardır.⁴⁷ (Şekil 2.2.)

İskemiye bağlı sitoplazmik Ca^{2+} artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu artan parçalanmaya yol açarak membran fosfolipitlerinin kaybına yol açar. İntraselüler Ca^{2+} artışı ile aktive olan proteazlar hücre iskeletine zarar verebilirler. Fosfolipit parçalanması sonucu iskemik hücrelerde biriken bu katabolik ürünler, membranlar üzerinde deterjan etkisi yapar. Membran hasarının mekanizmaları ne olursa olsun sonuç, yukarıda tanımlanan olaylarla Ca^{2+} 'ın bol miktarda hücre içine girmesidir (Şekil 2.1.).⁴⁷

İskeminin hücresel etkileri temel olarak:

- membran potansiyelinin değişmesi,
- iyon dağılımının değişmesi (intraselüler $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{2+}$),
- hücresel şişme,
- hücre iskeletinin disorganizasyonu,
- azalmış ATP,
- artmış hipoksantin,
- azalmış fosfokreatin,
- hücresel asidoz,
- GSH düzeyinde azalma şeklinde özetlenebilir.³⁷(Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. İskemide purin metabolizmasının gelişimi ve KDH'ın KO'a transformasyonu, reperfüzyon ile beraber doku hasarı gelişimi.⁵⁰

Kan akımının kesilmesini takiben ortaya çıkan organ disfonksiyonunun nedeni reperfüzyon sonrası meydana gelen hücre hasarı ve organ hassasiyetinin artmasıdır.

2.5. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Lökositlerin Rolü

SOR'ların önemli bir kaynağı aktive olmuş lökositlerdir; bu hücreler ayrıca salıverdikleri sitotoksik enzimler ve mikrosirkülasyonda oluşturdukları obstrüksiyonla da İ/R hasarına katkıda bulunabilirler. Çizgili kasta, İ/R periyodundan sonra lökositlerin biriktiği gösterilmiştir.⁵¹ İ/R, lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonuna neden olur. Polimorf nüveli lökositler (PMNL) de, endotel hücrelerine benzer şekilde SOR üretme kapasitesine sahiptir. İ/R hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar;⁵²

1. Mikrovasküler oklüzyon

2. SOR'ların salınması
3. Sitotoksik enzim salınması
4. Vasküler permeabilite artışı
5. Sitokin salınımında artış şeklinde sıralanabilir.⁵²

PMNL'in başlangıçtaki kemoatraksiyonları endotel hücreleri ve KO aracılığı ile gerçekleşir. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur. Lökosit adhezyon molekülleri lökositlerde ve diğer başka hücrelerde de bulunan gelişme, haberleşme, inflamasyon ve apoptosis gibi çok sayıda ve çeşitte biyolojik olaylarda rol alan yapılardır. Selektin grubu adhezyon molekülleri, doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele, PMNL'lerin başlangıçtaki adhezyonunda rol alırlar. E, L ve P selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır.

İ/R, endotelde P-selektin ekskresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteye sahip lökosit-endotel bağlantısını oluşturur. İkinci aşamada lökosit Beta-2 integrinler ile endotelial intersellüler adhezyon molekülü 1 arasında etkileşim sonucu lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşamada platelet endotelial hücre adhezyon molekülü 1 ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gelişir. Aktive lökositler ekstrasvasküler kompartmana ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis). Burada aktive lökosit yanıtı şu mekanizmalar ile olur,^{14, 15, 34, 35}

1. Fosfolipaz A₂ aktivasyonu sonucu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandin ve lökotrienler) üretilir.
2. Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır.
3. SOR'ların üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü mediyatörleridir ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirir. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya dilüe etmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu mikrovasküler permeabilite artışı, tromboz, ödem ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümü ile lenfatik dolaşım vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırılırlar.⁵² Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve Tumor Nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler gözlenir. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1'in hem de TNF- α 'nın vasküler yaralanmaya katkıda bulundukları ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir.^{14,15} İ/R de sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direk mi yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir.⁵³

2.6. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Serbest Radikallerin Rolü

Yaşamın sürekliliğinin sağlanması, hareket, iş yapabilme ve büyüme gibi bütün fizyolojik olaylar, enerji tarafından sağlanır. Tüm diğer aerobik canlılar gibi, yaşamak için O₂'ye ihtiyaç duyan insanlar da, enerji gereksinimini, oksidatif metabolizma yani aerobik metabolizma sonucu elde eder. Aerobik metabolizma, karbon ve hidrojen içeren metabolitlerin, CO₂ ve H₂O'ya tamamen yükseltgenmesini kapsar.¹ O₂, oksidatif metabolizma sırasında enerji eldesi için H₂O'ya indirgenirken çok az bir kısmı da “serbest radikaller” adı verilen, elektronlarını kaybetmiş zararlı maddelere dönüşür. Serbest radikaller, tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküllerle kolayca elektron alışverişi yapabilir veya onlarla birleşebilirler. Böylece diğer molekülerin yapı ve fonksiyonlarını değiştirebilir, hatta çok sayıda hücre ve doku hasarları meydana getirebilirler.

Elektron ve proton sayıları eşit olmayan yapı iyon olarak adlandırılır. İyonlar oldukça kararsız yapılardır ve yüksek enerjilerinden kurtulmak için ortamdaki başka atom veya moleküller ile etkileşime girerler. Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya molekül olarak tanımlanır. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir. Organizmada çok çeşitli serbest radikaller oluşmakta ve hücre, doku ve organlarda radikalik hasarlara yol açmaktadır. Bu açıdan serbest radikaller son yıllarda büyük bir ilgi alanı oluşturmaktadır. İnsanda her yıl 2 kg $O_2^{\bullet-}$ olduğu bildirilmiştir. Organizmanın aldığı O_2 'nin %5'den fazlası O_2 türevi radikallere dönüşerek hasar oluşturur.⁵⁴ SOR organizmada, enerjetik, reaktif ve metabolik olmak üzere üç ana mekanizmayla oluşmakta, metabolik reaksiyonlar en önemli SOR kaynağı olarak karşımıza çıkmakta, oluşan SOR'lar yüksek derecede reaktif olmalarından dolayı da hücrelerde zararlı etkiler meydana getirmektedirler.⁵⁵ Her hücre için intrinsik oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin fizyolojik sınırlarda tutulması doku ve organlar için oldukça önemlidir.⁵⁵⁻⁵⁷ Singlet oksijenin ($^1O_2$) eliminasyonunda (süpürülerek temizlenmesinde) β -karoten ve öteki karotenoidler kadar vitamin A ve diğer retinoidler etkili olurlarken, H_2O_2 , Selenyum (Se) içeren GSH-Px enzimi tarafından, $O_2^{\bullet-}$ ise bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren sitoplazmik enzimler ya da mangenez (Mn) içeren mitokondriyal SOD tarafından etkili biçimde elimine edilmektedir.⁵⁷ Oksidatif strese bağlı olarak lipidler, proteinler, enzimler, karbonhidratlar, ve DNA zarar görebilmekte, membranlardaki hasarın neticesinde DNA zincirlerinde rastgele kırılmalar ve bağlanmalar meydana gelebilmekte, enzim ve yapısal proteinlerin zarar görmesi hücrenin ölmesiyle sonlanabileceği gibi bu olgular kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar ile diyabet ve otoimmün bozuklukların gelişiminde

moleküler temeli oluşturmaktadır.^{55, 57, 58} Bazı nörodejeneratif hastalıklarda önemli oranda kan-beyin engelini aşabilen antioksidanlara ihtiyaç vardır.^{55, 57-59}

Hava kirliliği, sigara kullanımı, kötü beslenme alışkanlıkları (alkol tüketimi, yetersiz ve kalitesiz beslenme), stres de eksojen ve endojen olarak SOR oluşumunu arttırmaktadır.⁵⁹ SOR'ların, ilaç ve toksinle oluşan reaksiyonlar, kurşun zehirlenmesi, aminoglikozit nefrotoksitesisi, ağır metal nefrotoksitesisi, karbon tetraklorüre bağlı karaciğer hasarı, glomerulonefritis, hepatit B, İ/R, E Vitamini eksikliği, kanser, amfizem, hiperoksi, bronkopulmoner displazi, arteroskleroz, pankreatitis ve romatoid artrit gibi pek çok hastalığın patogenezisinde etkili oldukları öne sürülmektedir.^{60, 61} Organizmada çok çeşitli serbest radikaller oluşmakta ve yaygın hasara yol açmaktadır. Bu nedenle serbest radikaller son yıllarda büyük bir ilgi alanı oluşturmaktadır. Organizmanın antioksidan kapasitesinin yetersizliği durumunda, metabolik reaksiyonlar hücreler için zararlı olmakta ve önlenemeyen bu zararlı reaksiyonlar neticesinde deride akne ve kırıxıklık, prematür yaşlanma, koroner damar hastalıkları, diyabet, Alzheimer, Parkinson ve çok sayıda kanser türlerinin oluşmasına zemin hazırlamaktadır.^{62, 63} Serbest radikaller, organizmada, diğer metabolik yolların işleyişi sırasında da oluşabilmekte veya çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de meydana gelebilmektedir. Birçok hastalığın oluşması ve patolojik durumun ortaya çıkmasında serbest radikallerin rolü vardır.⁶⁴⁻⁶⁶

$O_2^{\bullet-}$ radikalinin kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. $O_2^{\bullet-}$, O_2 molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan SOD aracılığı ile H_2O_2 'e indirgenir. H_2O_2 eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir.⁶⁷ H_2O_2 yalnız başına çok reaktif değildir. Bununla beraber hücrelerde $OH^{\bullet}$

arttırabilmesi nedeniyle çoğunlukla hücreler için toksik etki göstermektedir.⁶⁸ Serbest radikaller, $\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^\bullet$, nitrik oksit ($\text{NO}^\bullet$) ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir.⁶⁹ Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, O_2 'den oluşan radikallerdir. O_2 , $\text{O}_2^\bullet$ grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, Cu^{2+} içeren bir enzim olan SOD aracılığıyla H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürülür. $\text{O}_2^\bullet$ grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan CAT ve GSH-Px gibi enzimlerle H_2O ve O_2 gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Dietilditiyokarbamat gibi SOD'un etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonu hızlandırırlar. Ayrıca CAT'ın etkinliğini engelleyen maddeler (aminotriazol gibi herbisidler) de etkin O_2 gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır.^{70,71}

Hücrel hasar oluşumunda özellikle üç tip reaksiyon önem taşımaktadır,^{67, 72}

1. Lipid Peroksidasyonu: SOR'lar, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. $\text{OH}^\bullet$ membran lipidleri ile çift bağ yapar ve böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (MDA, dien konjugatları gibi) oluşur. Eritrosit membranlarının, lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması ile bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar.

2. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: SOR'lar, aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel önemi olan enzimlerde bozulmalar ortaya çıkar.

3. DNA hasarı: SOR'lar, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tipte hücre ölümü olur. Reoksidasyon sırasında allopurinol (ksantin oksidaz inhibitörü), SOD veya CAT uygulamasının endotel hücre hasarını önlediği gösterilmiştir.^{67,72}

2.7. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Kompleman Sisteminin Rolü

Kompleman sistemi plazmada inaktif formda bulunan enzimlerin kademeli aktivasyonu ile inflamatuvar peptidlerin, opsoninlerin ve hücre zarı saldırı kompleksinin şekillendiği bir yoldur. Bu yolda oluşan proteinler anafilatoksik, inflamasyon bölgelerinde vazodilatasyon oluşturan, vasküler permeabiliteyi artıran (C3a, C4a, C5a) ve fagositlerin endotele yapışmasını uyarıcı özellikte etkiler gösterirler. Kompleman sistemi klasik ve alternatif yol (properdin yolu) ve bu iki yolun birleşerek terminal yol ve sonucunda oluşan hücre membranı saldırı kompleksini kapsamaktadır. Mannoz bağlayıcı lektinin etkin olduğu lektin yolu da klasik yolla birleşmektedir. Hepatositler, monositler, makrofajlar, böbreğin tübüler ve glomerüler hücreleri kompleman komponentlerinin sentez yerlerinden bazılarıdır. Kompleman sistemi proteinleri, serum total proteinin %10'unu oluşturur, beyin omurilik sıvısında ise kompleman düzeyleri düşük düzeydedir. Kompleman sistemi yaklaşık olarak 35 proteine sahip olup bazı enzimler (C2, C1r, C1s, Faktör B, Faktör D), kofaktörler, inhibitör veya inaktivatörler, membran bağımlı protein ve reseptörler (C1q, C3a, C4a, C5a, CR1, CR2, CR3) içerir. Bunlara ek olarak; CD55-CD59 gibi membran bileşenleri ve C8 ve C9 gibi membran inhibitörleri de kompleman sisteminin önemli düzenleyici proteinleridir.^{52, 73-76}

Aktivasyon sırasında kompleman komponentlerinin çoğu enzimatik olarak, biri daha büyük olmak üzere, 2 parçaya ayrılır. Küçük parça anafilatoksik, kemotaksik ve

vasküler geçirgenliği artırıcı özellikler gösterirken, büyük fragman bakteri zarları veya immunkompleks gibi farklı yüzeylere bağlanma ve bir sonraki komponenti aktive edici enzimatik bölgeye sahiptirler.

Kompleman sistemi üç yol ile aktive olur.

1. Antikor bağımlı klasik yol
2. Antikor bağımsız alternatif yol
3. Lektin yolu

1. Antikor bağımlı klasik yol: Antijen-antikor immun kompleksler, fibronektin ve fibrinojen klasik yolun aktivatörleridir. Salmonella gibi düşük virulanslı bazı bakteriler, gram negatif bakteriler, parainfluenza virüs gibi virüsler C1q ile direkt olarak etkileşime girerek klasik yolu antikor yokluğunda aktive edebilir. Klasik yolun immunolojik olmayan aktivatörleri de bulunmaktadır. Ürat kristalleri, denatüre DNA, RNA tümör virusleri, bakteri endotoksini, bazı polianyonlar, eş-molar heparin: protamin klasik yolu dolaysız olarak aktive edebilirler. IgG ve alt grupları, IgM grubu immunoglobulinler de klasik yolu aktive edebilir. Bir tek IgM veya iki IgG'nin bakteri veya virüsle enfekte olmuş host hücresi yüzeyine bağlanması, aktivasyon için yeterlidir. Çözünür antijenler ise ancak büyük multimoleküler antijen-antikor kompleksleri (immunkompleks) halinde kompleman sistemini aktifleştirirler. Sistem aktivasyonu C1 proteinin bu maddelerden birine direkt bağlanması ile yada plazmin gibi bazı fibrinolitik enzimlerin C1 üzerine doğrudan enzimatik saldırısıyla başlar. Antikorum C1'e bağlanması ile serin proteaz aktive olur. C4C2'nin C4bC2a'ya dönüşümünü sağlar. C4bC2a ise C3'ün C3a ve C3b dönüşümünü sağlar. C3b fagositler için opsonin görevi yapar. Ayrıca C3b, C5 'in bağlanması için yer oluşturur. C5 membran atak kompleksin

oluşumunu başlatır ve hücre zarında porlar meydana getirerek hücre lizisine neden olur.⁵²

2. Antikor bağımsız Alternatif yol (Properdin Yolu) : E.koli, tripanozoma, diğer parazitler, virüsle enfekte olmuş hücreler, maya hücre duvarı, kobra venom faktörü, nefritik faktör, dekstran sülfat, polivinil sülfat, nöraminidaz ile muamele edilmiş eritrositler, insanda diğer memelilerin eritrositleri, antijen-antikor kompleksleri, Ig A ve klasik yolu aktive eden immunglobulinler, lipopolisakkarid ve diğer bakteri ürünleri kompleman sistemini alternatif yol aracılığı ile aktive ederler. Alternatif yol bakteri hücumunda ön safta yer alır ve henüz konağın antikor üretimi için yeterli zaman bulamadığı dönemde devreye girer. Klasik yolun etkinleştirilmesi sonucunda aktifleşen C3 de, alternatif yolu aktive edebilmektedir. C3 klasik ve alternatif yolun birleştiği noktada yer alır ve kompleman sisteminin en önemli üyelerinden biridir. Dolaşımda C3 proteolitik enzimlerin etkisi ile C3a ve C3b'ye ayrılmakta, ancak faktör I ve H ile sürekli olarak inaktive edilerek düşük düzeyde tutulmaktadır. Patojen mikroorganizmaların polisakkarid ve lipopolisakkaridleri varlığında bu denge bozulduğunda C3b, faktör B ve D ile etkileşime girer. Dolaşımda devamlı olarak hidrolize uğrayarak farklı bir konformasyona çevrilen C3, faktör B'ye, bu ikiliye de faktör D bağlanır ve sonuçta faktör B kırılır. Geride kalan kompleks, alternatif yol C3 konvertazdır. Properdin, bu konvertaza bağlanır ve onu stabilize eder ve kompleman kaskadının devamını sağlar. Faktör D, plazmada aktif halde bulunan bir proteazdır.⁵²

3. Lektin Yolu: Doğal bağışıklıkta, henüz kazanılmış immun cevap oluşmadan önceki devrede, önemli rol üstlenir. Mikroorganizmaların yüzeylerindeki mannoz ve N-asetilglukozamin gibi karbonhidratları tanıyan kollektin ailesinin bir üyesi olan mannoz bağlayıcı lektin (MBL) de klasik kompleman yolunu aktive edebilmektedir.⁵²

Yapılan çok sayıda çalışma da İ/R hasarında kompleman sistemin her 3 yolunun da aktive olduğu gösterilmiştir.⁷⁷⁻⁷⁹ Kalp kasında reperfüzyon sırasında kompleman aktivasyonunu gösteren bir çalışmada komplemanın klasik yolu C1 inhibitörü kullanılarak inhibe edilmiş ve iskemik miyokardın reperfüzyon hasarından efektif olarak korunduğu gözlenmişti.⁸⁰

2.8. Antioksidanlar

“İnsanlarda fizyolojik şartlarda oluşan SOR veya serbest nitrojen radikallerinden birinin ya da her ikisinin de olumsuz etkilerini azaltabilen maddelerdir” şeklinde ifade edilebilir. Yani oksidan ve antioksidanlar arasında bir denge durumunun olması hayat için esastır.⁶²

Antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olarak incelenirler: CAT, SOD, GSH-Px birinci derece enzimatiklere, glukoz 6- fosfat dehidrogenaz ve glutatyon redüktaz ikinci derece enzimatikler için örnek gösterilmektedir.^{55, 58} Non-enzimatik olanlar ise; Karotenoitler (lutein, β -karoten, zeaksantin likopen), polifenoller, mineral (Se, Zn),⁸¹ düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar (GSH-Px, ürik asit), vitamin (A, C, E ve K) ve antioksidan ko-faktörler (Koenzim Q10) şeklinde incelenmektedir.^{55, 56, 58} Ayrıca antioksidanlar; eksojen (karoten, A, C ve E vitamini), endojen (melatonin, SOD, GSH-Px, CAT), vitamin (C vitamini), iz element (Mg, Se), protein (melatonin), hidrofilik (askorbik asit, ürat, flavonoidler),⁸¹ kompleks bileşik (kateşinler, epigallaktokateşin), hidrofobik (β -karoten, α -tokoferol), direkt etkili (SOD, CAT), indirekt etkili (E vitamini) olanlar şeklinde sınıflandırılabilirdiği gibi, membran (vitamin A ve E, β - karoten), sitosol (Koenzim Q10), dolaşım (C vitamini, aminoasitler ve polifenoller), ve sistem (Se, Zn) antioksidanları şeklinde de sınıflandırılmaktadır.^{55, 56, 58,}

62, 82, 83

Birçok hastalığın oluşması ve patolojik durumun ortaya çıkmasında serbest radikallerin rolü vardır.^{64-66, 84} Bunun yanı sıra, bu molekülleri yakalayıp etkisiz hale getiren, “antioksidan” adı verilen maddeler bulunur. Antioksidanlar, bu moleküllerin doku savaşlarında etkisiz hale gelmesini sağlayabilirler. Normal şartlarda vücut, doğal antioksidan sistemleriyle serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Vücudun antioksidan savunması ile serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik sonucu, hücrelerin lipid tabakası peroksidasyona uğrayarak, oksidatif stres şeklinde adlandırılan hücre hasarları meydana gelir. Çevreden ve besinlerle, oksidan etkili zararlı maddelerin vücuda alınmasının yanı sıra, yaşın ilerlemesiyle ortaya çıkan azalan enzim aktivitesine bağlı olarak da vücudun antioksidan savunma mekanizması yetersiz kalabilmektedir. Neyse ki, antioksidan görevleri olan çeşitli vitaminler, mineraller ve belirli enzimlerin dışarıdan vücuda alınabilmesi yanında, beslenme de iyi bir antioksidan savunma aracı olabilmektedir.^{65, 66, 69, 85}

Antioksidanlar insan bedenini SOR ve serbest radikallere karşı korurlar. Lipit peroksidasyonunun yanı sıra çok sayıda kronik hastalığın sürecini geciktirirler. Son yıllarda, doğal alternatif ve güvenilir gıda antioksidanlarının ve özellikle bitkisel kaynaklı doğal antioksidan araştırmaları üzerine büyük bir ilgi olduğu görülmektedir. Antioksidanlar sıklıkla ilave besinlerle, oksidanların radikal zincir reaksiyonlarını engeller ve oksidasyon sürecini geciktirirler.⁸⁴

Antioksidan enzimler için SOD, CAT, GSH-Px birincil antioksidanlardır. Serbest radikalleri, biyolojik açıdan önemi olan moleküllerle etkileşmeden önce daha zararsız bileşiklere dönüştürerek ya da farklı moleküllerden radikal üretimini engelleyerek etkilerini gösterirler.^{17, 26}

Oksidanlar hedef hücrelerde çeşitli farklı biyokimyasal değişiklikleri kapsar ve lökositlerin uyarılmasıyla oluşturulurlar. Hipokloröz asit, klorid iyonlarının varlığında

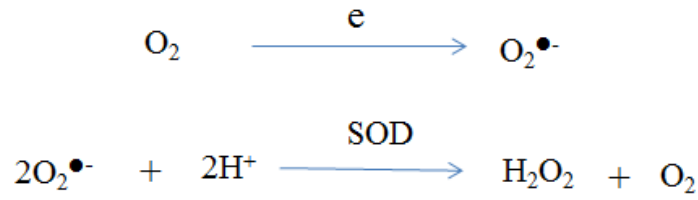
H₂O₂ üzerinde peroksidaz aktiviteyle düşük molar konsantrasyonlarda (10-20 µM) üretilerek hücre membran proteinlerine zarar vererek fonksiyonlarını bozarlar. H₂O₂ hızlı bir şekilde hücrelere nüfuz ederek hem glikolitik ve hemde oksidatif fosforilasyon (mitokondrial) yolları üzerinden ATP'nin sentezinin inhibisyonuna neden olur. Glikolitik yolda hasar; gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) içeren basamakta sınırlıdır. Bu durum hem H₂O₂'in GAPDH üzerine hücumu hemde GAPDH kofaktörü nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) konsantrasyonunda azalmadan kaynaklanmaktadır. Bu etkilerin DNA onarımında rol alan bir enzimi içeren (ADP)-riboz polimeraz enziminin aktivasyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir.⁶⁹ Hedef hücrelerde meydana gelen DNA hasarı pek çok hücre tipinde H₂O₂'in düşük konsantrasyonlarda (20-80 µM) bulunduğu gösterilmiştir. Bir geçiş metal iyonları varlığında H₂O₂'den oluşan OH[•] oluşumuyla sonuçlanan iplik kırılması ve baz hidroksilasyon olduğu gösterilmiştir. Hem hücre hasarı hemde ölümü veya amino asitlerin ve baz sırasında meydana gelen mutasyonlar DNA hasarına neden olmaktadır.⁶⁹ O₂^{•-} gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu ¹O₂, hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Lipid peroksitler, indirgenmiş GSH bağımlı Se içeren bir enzim olan GSH-Px tarafından lipid alkollere dönüştürülüp inaktive edilirse de, gerek O₂^{•-} gruplarıyla fazla miktarda lipid peroksitlerin şekillendirilmesi hem Se eksikliği hemde ortamdaki GSH'nın tükenmesine neden olabilen dietilmaleat, dioksin gibi maddelerin bulunması, lipid hidroperoksitlerinden serbest lipid grupların oluşmasına yol açar. Serbest lipid grupları da, ayrıca doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Lipid hidroperoksitlerin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehydler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da başlangıçtaki

etki alanlarında diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarak sekonder bozuklukların da göstergesi olabilirler. Beyin, oksidatif hasara en duyarlı bölgedir. Serbest radikaller, santral sinir sisteminin patolojik durumlarının çoğunluğunda, doğrudan doku hasarı oluştururlar. Serbest oksijen türleri, ekzitotoksisite, metabolik disfonksiyon ve Ca^{2+} intraselüler homeostazisinde bozulma gibi çoğul mekanizmalarla doku hasarı meydana getirirler.^{70, 71, 86, 87}

2.8.1. Antioksidan Enzimler

Süperoksit dismutaz (SOD)

H_2O_2 , O_2 metabolizmasının bir ürünü olarak organizmalarda doğal bir şekilde üretilir. SOD, $\text{O}_2^{\bullet-}$ 'in H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.⁶⁸

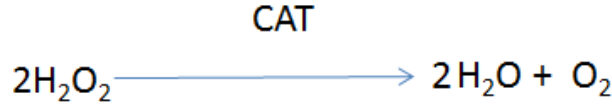


Normal metabolizma esnasında hücreler tarafından yüksek düzeyde O_2 üretilmesine rağmen SOD tarafından hücre içi düzeyi düşük tutulur. Ancak, H_2O_2 ortamda metal iyonu varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile son derece aktif $\text{OH}^{\bullet}$ radikaline dönüşmektedir. Bu durumda CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesi artarak H_2O_2 düzeylerini kontrol altına almaktadır.⁸⁸

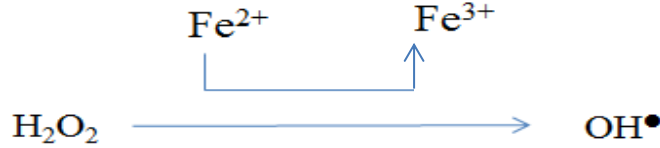
Katalaz (CAT)

CAT, demir içeren temel olarak peroksisomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda yer alır. Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. CAT, H_2O_2 'yi O_2 ve H_2O 'ya parçalar. Bu şekilde H_2O_2 'ten $\text{OH}^{\bullet}$ oluşumunu

önleyebilmek amacıyla H_2O_2 'nin süpürülmesi sağlanır.⁸⁸ Ayrıca CAT H_2O_2 'e spesifik olup diğer organik peroksitlere etki etmez.^{89, 90} CAT'ın esas fonksiyonu H_2O_2 'in parçalanmasını katalize etmektir ve SOD ile GSH-Px'e benzer şekilde CAT aktivitesi de oksidatif kaslarda (tip I) en yüksek iken büyük oranda hızlı (tip II) kas liflerinde ise en düşüktür.



Ancak H_2O_2 , geçiş metalleri varlığında toksik $OH^\bullet$ radikaline dönüşür. Fenton reaksiyonu.



Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

GSH bağımlı antioksidan savunma sistemi reaktif serbest radikaller ve diğer oksidan türlerine karşı hücresel savunmada temel bir rol oynar.^{91,92} Endojen antioksidanların en önemlilerinden biri GSH'dur.⁹³ GSH hücre içi majör olmayan bir protein olan tiyoldür. Hücrede serbest ya da çeşitli moleküllere (özellikle proteinlere) bağlı olarak bulunabilmektedir. Serbest GSH formu indirgenmiş GSH veya oksitlenmiş tiyol (GSSG) formlarında bulunur. Biyolojik sistemler H_2O_2 üretebilirler.⁶⁸ GSH-Px, H_2O_2 metabolize eden bir enzimdir. Bu reaksiyon sırasında H^+ verici olarak fonksiyon görüp H_2O_2 indirgenirken GSH ise okside şekline (GSSG) dönüşür. Okside glutasyon NADPH bağımlı GSH-R tarafından tekrar GSH'ya indirgenir. GSH-Px'ın fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal etkisi ile fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili

antioksidandır.⁹⁴ Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelerde düşük bulunmuştur. Lökosit GSH-Px aktivitesi ise yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur.⁹⁵ Yapılan araştırmalar GSH eksikliğinin oksidatif strese neden olduğu ve Alzheimer, epilepsi, Parkinson, kistik fibrozis, karaciğer hastalıkları, kanser, orak hücreli anemi, AIDS, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi çok sayıda hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymaktadır.⁹⁶

Malondialdehit (MDA)

Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan, membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olay veya lipid moleküllerindeki iki ansatüre bağ arasında yerleşmiş metilen grubundan bir H₂ atomunun çıkması ile başlatılan kompleks bir fenomendir. Sonuçta yeni bir karbon merkezli lipid serbest radikali (L•) oluşur.^{97, 98} Oluşan lipit radikali dayanıksızdır. Lipit radikalının moleküler O₂ ile reaksiyona girmesi sonucu lipit peroksit radikali (LOO•) meydana gelmektedir. Bu radikaller de membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan H₂ atomlarını alarak Lipit Hidroperoksitler'ine (LOOH) dönüşmektedir. LOOH, Fenton tipi bir reaksiyonla aldehit ve alkanlar oluşur. Üretilen hidroperoksitler daha fazla radikali yıkarak, lipit peroksit, etan ve pentan gibi uçucu gazlar oluşur. Aldehitler en toksik ürünlerdir.⁹⁹ Bu son ürünler nispeten daha stabil bir son ürün olan ve lipid peroksidasyonunun markeri olarak kullanılabilen MDA'ya dönüşür.⁹⁸ Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği

nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir.^{65, 97, 100, 101}

Laktat Dehidrogenaz (LDH)

Laktat Dehidrogenaz (LDH) (L-laktat: NAD⁺- oksidoredüktaz) sitozolik bir enzim olup aşağıdaki reaksiyonu katalizlemektedir.^{102, 103}



LDH ve izoenzimleri kas hasarını yansıtır ve sitoplazmada bulunurlar. LDH'nin herbiri farklı dokularda bulunan beş enzim çeşidi vardır. LDH1 ve LDH2 en yoğun şekilde miyokard da, LDH3 daha çoğunlukla akciğerler, böbrek ve dalakta bulunurlar.^{104, 105} İskelet kası patolojilerinde LDH4 ve LDH5 izoenzim aktivitesinde yükselmeler ortaya çıkar.¹⁰⁶ Aslında LDH4'ün iskelet kasına özel olduğu düşünülür. LDH5 yükselmesi de kas hasarını yansıtıyor olsa da karaciğer tarafından da salındığından bu enzime çok fazla klinik mana atfedilmez.¹⁰⁴

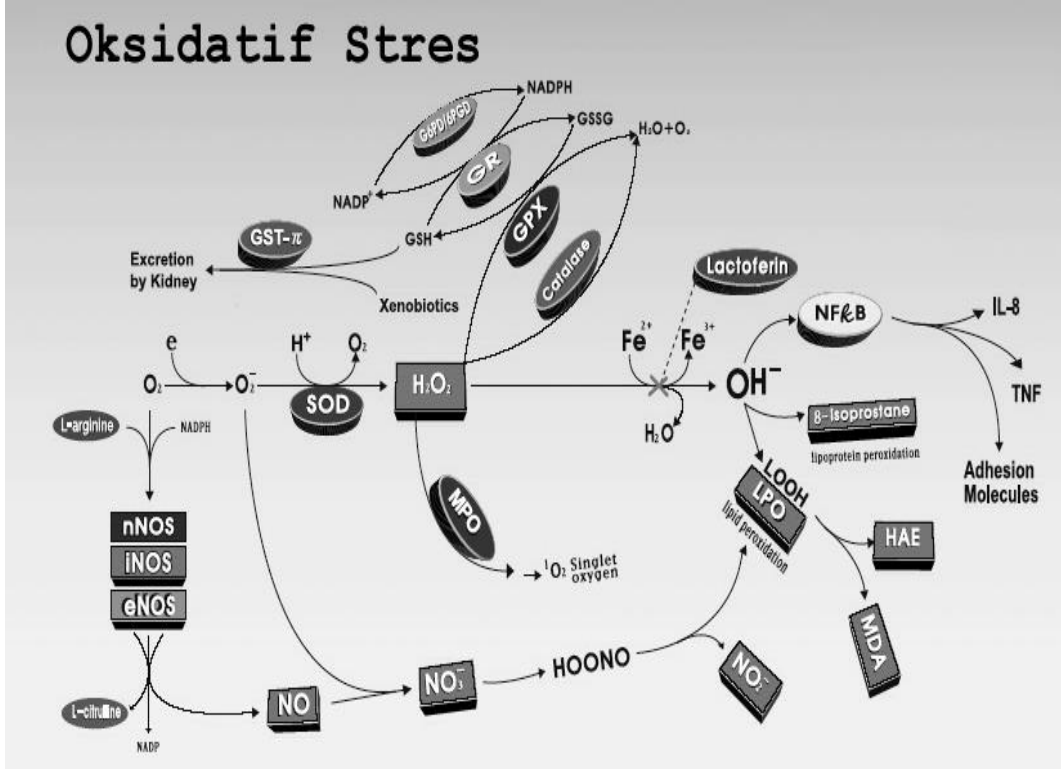
Kreatin Kinaz (CK)

CK hücrelerde enerji akışının kontrolünde fonksiyon gören bir enzimdir. Kaslarda ADP ile kreatin fosfattan ATP sentezini katalizleyen dimerik bir enzimdir. CK'nın üç farklı tipi vardır. Bunlar CK-BB, CK-MB, CK-MM'dir. CK-MM temel olarak iskelet kasında, CK-MB kalp kasında, CK-BB beyin dokusu, akciğer, tiroid, genitoüriner sistemde ve gastrointestinal sistem de bulunur.¹⁰⁷ Yüksek enerjili fosfat gruplarının geçici bir depolanma şekli olan fosfokreatinden, fosfat grubunu ADP'ye transfer ederek enerjinin hemen kullanılabilir şekli olan ATP'nin oluşumunu sağlamak ve kreatinin ATP tarafından tekrar fosfokreatine fosforillenmesini katalizlemektir.¹⁰⁸ Serum veya plazma CK seviyesinin belirlenmesi, miyokard enfarktüsü teşhisinde

oldukça faydalıdır.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Serum CK seviyesi kas hastalıklarında, travma, sistemik hastalıklarda, egzersiz, kardiyolojik hastalıklar, status epileptikus, hipotroidizm, tekrarlayan intramusküler enjeksiyonlar, viral myozit, elektromiyografi, titremeli ateş ve malign hipertermi durumlarında artması ile önemli bilgiler vermektedir.¹¹²

2.9. Oksidatif Stres

Oksidatif stres SOR oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Prooksidan-antioksidan reaksiyon arasındaki eşitliğin bozulmasından kaynaklanır. SOR oksidatif stres ile indüklenerek aşırı miktarda üretilip DNA, RNA, hücrel lipitler ve proteinlerin normal fonksiyonlarını inhibe ederler. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece yukarıda açıklandığı üzere organizma, serbest radikallerden ve oluşturacakları hasardan etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır.¹¹³⁻¹¹⁶ (Şekil 2.4.)

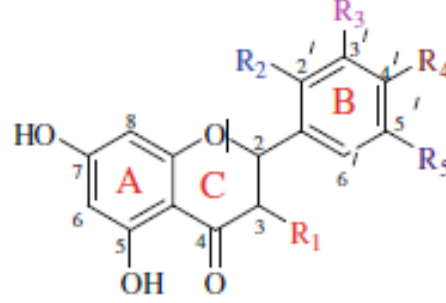


Şekil 2.4. Oksidatif Stres Mekanizması¹¹⁷

2.6. Naringin

Fenolik bileşikler, suda çözünen antioksidanların en önemli grubunu oluşturmaktadır. Fenolik bileşikler; bitkilerde doğal olarak bulunan ve antioksidan özelliğe sahip olan çok önemli sekonder metabolitlerdir. Çoğunlukla suda çözünür ve aromatik zincir halkasına bağlı bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu içeren, basit fenolik bileşiklerden, yüksek oranda polimerize olmuş çok sayıda fenolik maddeleri içeren geniş bir gruptur. Yapılarındaki farklılıklara rağmen fenolik bileşikler polifenoller olarak isimlendirilmektedir.¹¹⁸ Fenolik bileşikler temel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olarak ayrılır. Flavonoidler, fenolik bileşiklerin geniş bir grubunu oluşturur. Flavonoidler ve sinamik asitler en önemli antioksidan ve serbest radikal tutucu ve zincir kırıcılar olarak bilinmektedirler.¹¹⁹ Flavonoidler insan diyetindeki aynı zamanda bitkilerde de bulunan fenolik bileşiklerin en yaygın ve popüler grubudur. Koroner kalp hastalıklarına karşı koruyabilir ve antioksidan özelliklere sahiptirler.^{120, 121}

Flavonoidler çok etkili antioksidanlar olup düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu azaltarak kardivasküler hastalıklara karşı koruma sağlarlar.^{85, 122}

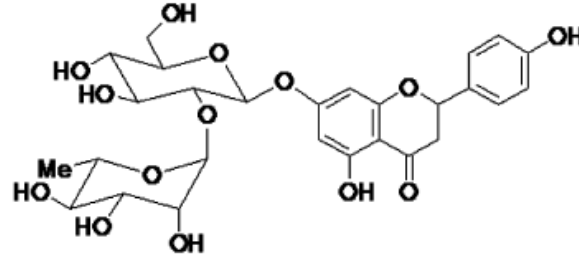


Şekil 2.5. Flavonoid molekülünün genel yapısı.⁸⁵

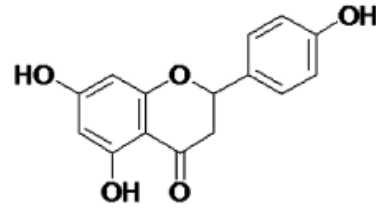
Naringin (4',5,7-trihidroksiflavon 7-rhamnoglukozit) bitkisel bir flavonoiddir. Naringin pek çok narenciye ve greyfurttaki en önemli ve aktif glikosid flavonandır.^{123, 124} Greyfurtta tipik acı tadı veren bileşiktir. Naringin saf şekli sarımsı bir toz formundadır. Oral olarak verildiği zaman intestinal mikroflora tarafından emilebilir formda olan en önemli metaboliti naringenine (4',5,7-trihidroksiflavon) hidrolize edilir.¹²⁵ Naringenin, antiülser^{126, 127} aorta dilatasyonu¹²⁸, süperoksit süpürücü ve antioksidant aktivitelere¹²⁴ sahip olduğu gösterilmiştir. Dahası naringin meme kanseri hücre proliferasyonunu ve meme tümörü gelişimini önleyici olduğu gösterilmiştir.¹²⁹

O₂ radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleri olduğu, flavonoidlerin birçoğunun lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksidasyonu oluşumunu engellediği, yapısındaki bazı grupların flavonoid radikallerinin stabilitesini ve böylece antioksidan kapasitesini artırabildiği, flavonoidlerin bunların dışında metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği⁸⁵ ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir.¹³⁰ Naringin serbest radikal süpürücü, lipid düşürücü, anti-enflamatuar, anti-kanserojen ve

antioksidan etkileri içeren çeşitli farmakolojik ve terapötik özellikler sergileyen bir flavonoiddir.



(A) naringin



(B) naringenin

Şekil 2.6. Naringin ve aktif metaboliti naringenin kimyasal yapısı.¹³¹

Özellikle İ/R hasarını azaltmaya dönük farklı organlarda yapılan çalışmalarda kullanılan naringenin, uygulama dozları ve süreleri çalışmamızda referans alınarak uygulanmıştır. Naringin için uygulanan dozlarda herhangi bir toksisite bulgusuna rastlanmamıştır. Bu doz uygulamaları antioksidan özelliğe sahip Naringin'in plazmada maksimum konsantrasyona ulaşma süresi de değerlendirilerek saptanmış olup uygulanan dozlar ile ilişkili olan birkaç örnek literatür sunulmuştur. Gaur ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada %1 Sodyum karboksimetil selüloz'da (SKS) çözdürülmüş naringin 50 ve 100 mg/kg dozda 7 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulamışlar ve herhangi bir toksisite görülmemiştir.¹³² Singh ve arkadaşlarının 45 dakika iskemi 24 saat reperfüzyon uyguladıkları renal İ/R çalışmasında naringini 400 mg/kg dozunda intragastrik olarak uygulamışlar ve herhangi bir toksisite görülmemiştir.

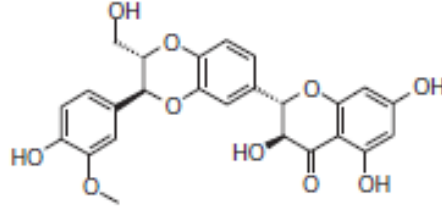
¹³³ Aggarwal ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 50 ve 100 mg/kg dozunda 10 gün süre ile uygulamışlar ve herhangi bir toksisite görülmemiştir.¹³⁴

Oral yoldan alındığında yavaş bir şekilde emilir, ortalama 6 saatte maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşır ve ortalama 10 saat içinde vücuttan atılır. Genelde safra yoluyla ve daha az miktarda idrar ile atılır. Suda çözünürlüğü oldukça azdır. Yang ve arkadaşları Sprague–Dawley cinsi rat çalışmasında 50, 250, 1250 mg/kg/gün tekrarlanan dozlarında Naringinin 1, 32, 93 ve 184 günlük zaman kesitlerinde ortalama plazma konsantrasyonlarını 6-8 saat olarak bildirmektedirler.¹³⁵

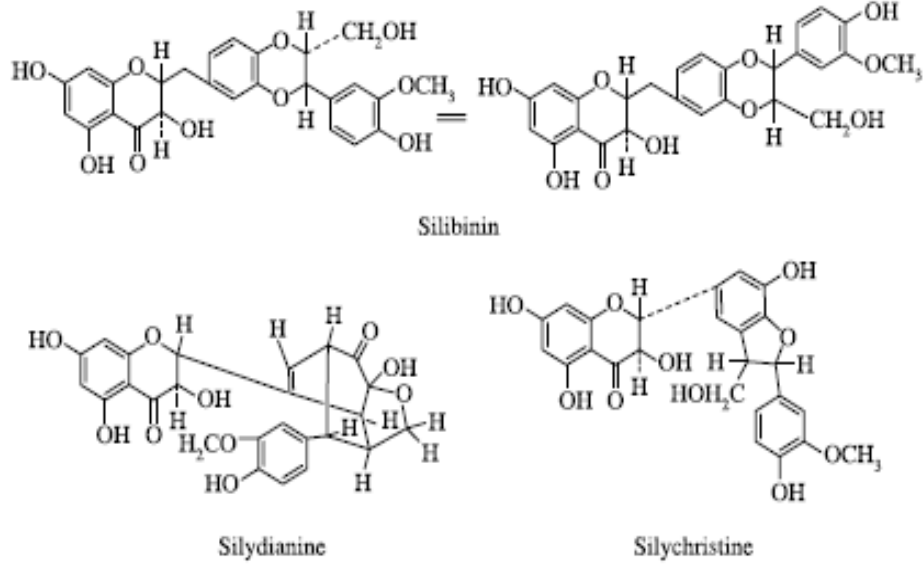
2.11. Silymarin

Silymarin, *Silybum marianum* bitkisinin meyve ve tohumlarında izole edilen, antik çağların iyice araştırılmış ve en eski bitkilerinden biri olup Asteraceae ailesi içinde türetilen yaygın olarak süt devedikeni olarak bilinen, benzopyranone sınıfına ait bitkisel bir flavonoid olup, varis, adet sorunları, depresyon, yetersiz anne sütü üretimi, karaciğer hastalıkları, siroz, kronik hepatitis, safra kesesi hastalıklarının tedavisinde ve kanser tedavisi için faydalı etkilere sahip olduğu bilinmektedir.¹³⁶⁻¹³⁸

Silybum marianum bitkisinin aktif komponenti silymarin standardize ekstraktı yaklaşık %70-80 silymarin flavonolignans (Silbin A ve B, isosilybin, silydianin, silychristin) ve flavonoidler (taksifolin ve kuersetin), ve %20-30 oksidize polifenolik ve polimerik bileşenleri içeren tanımlanmamış fraksiyon içerir.^{137, 139}



Şekil 2.7. Silymarinin kimyasal formülü.¹³⁶



Şekil 2.8. Silymarin yapısal bileşenleri, silbin, silidiyanin ve silikristin kimyasal formülü.¹³⁷

Köksal ve arkadaşları Silymarin'in in-vitro çalışmalarında antioksidan ve radikal giderici aktiviteye sahip olduğunu bildirmektedirler.¹³⁷ Şimdiye kadar çoğunlukla karaciğer koruyucular olarak kullanılan Silymarin ve Silbin kanser gelişimini önleyici, koruyucu ve antikanser aktivite gibi başka birçok ilginç aktiviteye sahiptir. Bu aktiviteler prostat, akciğerler, merkezi sinir sistemi, pankreas ve diğer organlar gibi farklı organların hastalıklarının büyük bir çeşidinde saptanmıştır. Silymarin/Silbin antioksidatif ve radikal süpürücü oluşumları tarafından hücre koruyucu aktivitelerinin¹³⁷ yanında aynı zamanda ilaç transportu ve inhibisyonu, P-glycoproteinler, östrojenik reseptörler, çekirdek reseptörleri ve başka diğerleri gibi spesifik reseptör etkileşimine

dayanan yeni aktiviteleri olduğu bulunmuştur. Silymarinin türevleri tedavi edici uygulamalarda yeni yollar açacaktır.

Silymarin biyolojik ve farmakolojik etkileri geniş bir yelpazeye sahip ve antioksidan içeren¹³⁷, protein sentezi ve hücre yenilenmesini uyaran (toksik karaciğer hasarı, kronik inflamatuvar karaciğer hastalıkları, karaciğer sirozu tedavisinde yarar sağlayan)^{137, 140, 141} ve birçok insan karsinom hücre hatlarına karşı etkileyici antikanser etkilere sahiptir.^{142, 143} Bunlara ek olarak, antidiyabetik aktivite,¹⁴⁴ kalbi koruyucu,¹⁴⁵ anti-enflamatuvar, anti-fibrotik, hipolipidemik, nörotrofik, nöroprotektif ve bağışıklığı düzenleyici etkileri tanımlanmıştır.¹⁴⁶ Silymarin suda çözünürlüğü (0.04 mg/ml) düşük rapor edilmektedir. Silymarin, suda çözünürlüğü düşük olsa bile hiçbir lipofilik özelliğe sahip değildir.¹⁴⁷ Silbin, silymarin kompleksinin birincil ve en önemli bileşenidir. Silymarinin tüm farmakokinetik parametreleri standardize edilmiş silbin olarak adlandırılır. Silymarin oral olarak alındığında hızlı bir şekilde 6 saat içinde emilir ve kanda maksimum seviyeye ulaşır. Oral silymarinin yalnızca %20-50'si büyük miktarda gastrointestinal kanaldan enterohepatik dolaşıma geçerek emilir. Silymarinin gastrointestinal kanaldan emilim düşük olması nedeniyle biyoyararlılığı düşüktür.¹⁴⁸ Wu ve arkadaşları rat plazmasında silymarinin (silbin olarak standardize edilmiş) oral biyoyararlanımı %0.73 olarak bildirmektedirler.¹⁴⁸ Silymarin sınırlı biyoyararlılığının dört başlıca nedeni, kapsamlı faz II metabolizması, bağırsak epitel hücreleri arasında düşük geçirgenlik, suda düşük çözünürlüğe sahip olması (0,5g/L) ve safra ve idrarla hızlı atılımıdır.¹⁴²

Silymarin/Silbin kemoprotektif ve kansere karşı koruyucu bir ajan olarak uygulanması ilk bakışta onun antiradikal potansiyeli ve dolayısıyla sitoprotektif aktivitesi olarak düşünülür. Bu kısmen doğrudur; ancak buradaki rolü diğer etkileri kadar iyi olduğu giderek daha iyi anlaşılmaktadır.¹⁴⁹ Silymarin/Silbin aynı zamanda

endotel hücre apoptozisini uyardığı ve tümör büyümesi ve metastazı için gerekli olan damar oluşumunu inhibe ettiği bilinmektedir.¹⁵⁰ Silymarinin antiaterosklerotik aktiviteye de sahip olduğu bildirilmektedir.¹⁵¹ Tüm bu etkilerinin yanı sıra silymarin aynı zamanda karbonik andihraz enzimi üzerine güçlü inhibitör etkiye sahiptir.¹³⁶ Silymarin/Silbin asıl olarak karaciğer toksisitelerini elimine etme ve kemoterapötikler tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı dokuyu koruyucu bir antioksidan olarak hareket eder. Ancak, antikanser aktivitesinin düşmesini önlemek için antioksidatif etki dengeli olmalıdır.

Özellikle İ/R hasarını azaltmaya dönük farklı organlarda yapılan çalışmalarda kullanılan silymarinin, uygulama dozları ve süreleri çalışmamızda referans alınarak uygulanmıştır. Silymarin için uygulanan dozlarda herhangi bir toksisite bulgusuna rastlanmamıştır. Bu doz uygulamaları antioksidan özelliğe sahip silymarinin plazmada maksimum konsantrasyona ulaşma süresi de değerlendirilerek saptanmış olup uygulanan dozlar ile ilişkili olan birkaç örnek literatür sunulmuştur. Raza ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada silymarin 200 mg/kg dozunda oral uygulamasında herhangi bir ilaç toksisitesi görülmediğini bildirmişlerdir.¹⁵² Raza ve arkadaşları serebral İ/R hasarı üzerinde öncelikle yaptıkları pilot doz çalışmasında silymarinin farklı dozlarda uygulanmasının etkilerini araştırmış ve nöron dejenerasyonuna karşı en iyi nöroprotektif korumayı sağlayan dozu tespit etmişlerdir. Ve buna bağlı olarak 200 mg/kg ve tek doz (1 gün) oral olarak uygulamışlardır.¹⁵² Bu doz farklı tipteki beyin hastalıkların da maksimum koruma sağlamaktadır.^{153, 154} Muley ve arkadaşları yaptıkları bir fokal iskemi çalışmasında silymarini 50, 100, 200 mg/kg şeklinde farklı dozlarda %1 Sodyum karboksimetil selüloz'da çözündürülerek 7 gün süre ile uygulamışlar. Son doz uygulamasında 24 saat sonra histopatolojik ve biyokimyasal analizler için deneyi tamamlamışlardır.¹⁵³ Rao ve arkadaşları miyokardiyal 30 dakika iskemi ve 4 saat

reperfüzyon uyguladıkları İ/R modeli çalışmasında 100, 250, 500 mg/kg dozlarında silymarini 7 gün boyunca uygulamışlardır.¹⁴⁵ Şentürk ve arkadaşlarının 45 dakika iskemi ve 6 saat reperfüzyon uyguladıkları renal İ/R çalışmasında 1 kez 50, 100 mg/kg dozlarında oral olarak uygulamışlardır.¹⁵⁵

Silymarin suda çözünürlüğü çok zayıftır. Oral yoldan alındığında yavaş bir şekilde emilir, ortalama 6 saatte maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşır ve ortalama 10 saat içinde vücuttan atılır. Genelde safra yoluyla ve daha az miktarda idrar ile atılır. Silymarinin ortalama yarılanma ömrü 6-8 saattir. Karaciğerde sülfat ve glukuronik asit ile konjuge olarak plazma ve safraya geçer. Safra yoluyla atıldıktan sonra bağırsak florası etkisiyle hidrolize edilerek yeniden emilir. Silymarin oral yoldan alındığında, hayvan modellerinde emilim oranının %35 civarında olduğu gösterilmiştir.

156-158

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama merkezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarı ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Ağırlıkları 250-300 g arasında olan 40 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan denekler Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama merkezi'nden (ATADEM) sağlandı.

Naringin (4',5,7-trihidroksiflavon 7-rhamnoglukozit), Silymarin (flavonolignans) ve Sodyum karboksimetil selülöz, Sigma-Aldrich firmasından sağlandı.

Serumda CK ve LDH ölçümleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda yapıldı.

Antioksidan enzim ölçümü İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmamızda cerrahi aletler kullanıldı.

Histopatoloji çalışmaları Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Laboratuvarı'nda yapıldı.

Deney öncesi iki haftalık sürede Sıçanlar laboratuvar hayvanları bakım ve kullanımına uygun olarak ad-libitum diet ve su verilerek laboratuvar koşullarına (20°C $\pm$ 2,12 saat aydınlık/12 saat karanlık) alıştırdı, bu süre içerisinde gıda ve su erişimi serbest bırakıldı. Opere edilecek ratlar bir gece önce aç bırakılarak sadece su ile beslenmeleri sağlandı. Ratlar tartıldı ve anestezi amacıyla Ketamin (Ketalar) 60 mg/kg dozunda ve Xylazin (Rompun) 10 mg/kg dozunda intraperitoneal kullanıldı. Orta hat insizyonu ile batin açılarak Aorta abdominalisten biyokimyasal analizler için 6 ml kadar kan örnekleri alındı ve devamında sol alt ekstremiteye ilerlenip sol gastrokinemiyus

kasına ulaşıp biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için kas dokusu örnekleri alındı. Deney sonunda, alınan kas örnekleri, serum fizyolojik ile yıkanarak alüminyum folyolara sarıldı ve -20 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Deney sonunda alınan kas örnekleri -80 °C'lik derin dondurucuya transfer edildi. Abdominal aortadan alınan kan örnekleri serum ayırma tüplerine alınarak oda ısısında 30 dk bekletildi. Daha sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda serumlar ependorf tüplere alınarak -20 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Deney sonunda serum örnekleri -80 °C'lik derin dondurucuya transfer edilerek muhafaza edildi.

3.1. Naringin ve Silymarin'in Hazırlanması ve Uygulanması

Naringin ve Silymarin Sigma-Aldrich firmasından firmasından temin edildi. Naringin ve Silymarin suda çözünmediği için %1'lik SKS çözeltisi çözücü ortam olarak kullanıldı. Bunun için 1 g SKS tartılarak 100 ml suda çözüldü. Hazırlanan bu %1'lik 100 ml SKS çözeltisi içinde 100 mg Naringin çözülerek 1 mililitresinde 1 mg naringin içeren çözelti hazırlandı. Yine Silymarin içinde %1'lik 100 ml SKS çözeltisi içinde 50 mg Silymarin çözülerek 1 mililitresinde 0,5 mg Silymarin içeren çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözelti oral gavaj kullanılarak intragastrik yolla üç doz olacak şekilde sıçanlara uygulandı.



Şekil 3.1. Ratlara gavaj ile ilaç uygulaması.

3.2. Grupların oluşturulması

Ağırlıkları 250-300 g arasında olan 40 adet Spraque-Dawley cinsi erkek sıçan randomize olacak şekilde 8'er sıçandan oluşan 5 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol grubu)

Herhangi bir iskemi modeli oluşturulmaksızın İ/R hasarının ve bu hasarı en aza indirmeye yönelik kullandığımız naringin ve silymarin grupları ile karşılaştırma amacıyla ketamin/Xylazin kokteyli ile (4 saat) anestezi oluşturulup orta hat insizyonu ile batın açılarak Aorta abdominalisten biyokimyasal anlizler için 6 ml kadar kan örnekleri alındı ve devamında sol alt ekstremiteye ilerlenip sol gastrokinemius kasına ulaşarak biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için kas dokusu örnekleri alınıp sakrifiye edildi.



Şekil 3.2. K Grubu ratların tam standardizasyon sağlanabilmesi için anestezi altında uyutulması.

Grup II (İ/R)

İskemi-reperfüzyondan önce %1'lik SKS 2,5 ml dozunda 8 saat arayla 3 kez intragastrik yol ile verildi. Deney hayvanları tartıldıktan sonra Darendelioğlu'nun çalışmasında uyguladığı İ/R modelini¹⁵⁹ oluşturmak için anestezi altına alınıp sol alt ekstremitte olabildiğince proksimalinden elastik bir turnike ile sıkıca bağlandı. Bu şekilde femoral arter ve kollaterallerinin oklüzyonu sağlanarak tek taraflı ekstremitte iskemisi oluşturuldu. Isı düşüşü ve pençenin siyanotik hale gelmesi (renginin morarması) iskemi olarak değerlendirildi. Turnikeler tüm deneklere aynı kişi tarafından uygulanarak tam standardizasyon sağlandı. 2 saatlik iskemi süresini takiben turnikeler açılarak 2 saatlik reperfüzyon başlatıldı. Pençe renginin normale dönüp pembeleşmesi reperfüzyon olarak değerlendirildi. Sol bacak renginin normale dönmesi ve distal nabızların alınabilmesi reperfüzyon olarak değerlendirildi. Reperfüzyon süresinin bitimiyle anestezi devam ettirilerek orta hat insizyonu ile batın açılarak Aorta abdominalisten biyokimyasal analizler için 6 ml kadar kan örnekleri alındı ve devamında

sol alt ekstremiteye ilerlenip sol gastrokinemius kasına ulaşıp biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için kas dokusu örnekleri alınarak sakrifiye edildi.



Şekil 3.3. İ/R modeli oluşturulan ratların anestezi altında uyutulması.

Grup III (İ/R ve Naringin)

İ/R oluşturmada öncesinde %1'lik SKS içinde çözündürülmüş 400 mg/kg dozunda naringin süspansiyonu 2,5 ml miktarında 8 saat arayla 3 kez intragastrik yol ile verildi. Deney hayvanları tartıldıktan sonra Grup II de anlatıldığı şekilde İ/R deneysel modeli gerçekleştirildi.

Grup IV (İ/R ve Silymarin)

İ/R oluşturmada öncesinde %1'lik SKS içinde çözündürülmüş 200 mg/kg dozunda silymarin süspansiyonu 2,5 ml miktarında 8 saat arayla 3 kez intragastrik yol ile verildi. Deney hayvanları tartıldıktan sonra Grup II de anlatıldığı şekilde İ/R deneysel modeli gerçekleştirildi.

Grup V (İskemi-Reperfüzyon ve Naringin ve Silymarin)

İ/R oluşturmada önce %1'lik SKS içinde çözöürölmüş 200 mg/kg dozunda silymarin ve %1'lik SKS içinde çözöürölmüş 400 mg/kg dozunda naringin süspansiyonu Grup III ve IV de anlatıldığı şekilde uygulandı. Deney hayvanları tartıldıktan sonra Grup II de anlatıldığı şekilde İ/R deneysel modeli gerçekleştirildi.

3.3. Deney Modelimizin Oluşturulması

3.3.1. Kontrol Modeli

K grubu modeli oluşturulurken tam standardizasyon sağlanması amacıyla cerrahi operasyondan önce %1'lik SKS 2,5 ml dozunda 8 saat arayla 3 kez intragastrik yol ile verildi. İ/R işlemi yapılmadığından ketamin/Xsilazin kokteyli ile anestezi oluşturulup orta hat insizyonu ile batin açılarak Aorta abdominalisten biyokimyasal analizler için 6 ml kadar kan örnekleri alındı ve devamında sol alt ekstremiteye ilerlenip sol gastrokinemius kasına ulaşılıp biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için kas dokusu örnekleri alınıp sakrifiye edildi.

3.3.2. İskemi-Reperfüzyon Modeli

Tam standardizasyon sağlanabilmesi açısından iskemi-reperfüzyondan önce %1'lik SKS 2,5 ml dozunda 8 saat arayla 3 kez intragastirik yol ile verildi. Deney hayvanları tartıldıktan sonra İ/R modelini oluşturmak için anestezi altına alınıp sol ekstremitte olabildiğince proksimalinden elastik bir turnike kullanılarak sıkıca bağlandı. Bu şekilde femoral arter ve kollaterallerinin oklüzyonu sağlanarak tek taraflı ekstremitte iskemisi oluşturuldu. Isı düşüşü ve pençenin siyanotik hale gelmesi (renginin morarması) iskemi olarak değerlendirildi. Turnikeler tüm deneklere aynı kişi tarafından uygulanarak tam standardizasyon sağlandı. 2 saatlik iskemi süresini takiben turnikeler açılarak 2 saatlik reperfüzyon başlatıldı. Pençe renginin normale dönüp pembeleşmesi

reperfüzyon olarak değerlendirildi. İ/R süresince denekler uyandıkça anestezi dozları tekrarlandı. Ayrıca anestezi süresince oluşabilecek hipotermiden korumak için elektrikli ısıtıcı ile tüm sıçanlar ısıtıldı. Reperfüzyon süresinin bitimiyle anestezi devam ettirilerek orta hat insizyonu ile batin açılarak Aorta abdominalisten biyokimyasal analizler için 6 ml kadar kan örnekleri alındı ve devamında sol alt ekstremiteye ilerlenip sol gastrokinemius kasına ulaşıp biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için kas dokusu örnekleri alınıp sakrifiye edildi.



Şekil 3.4. İ/R modelini oluşturmak için anestezi altında sol ekstremitte olabildiğince proksimalinden bir turnike yardımıyla femoral arter ve kollateralleri oklüzede edilerek tek taraflı alt ekstremitte iskemisi oluşturulması.



Şekil 3.5. İskemi uygulanan sol alt ekstremitedeki renk değişimi (morarma) ve şişlik.

3.4. Sakrifikasyon

Örneklerin alınmasından sonra tüm deneklerin kalbinden kanı alınarak sakrifiye edildi.

3.5. Biyokimyasal Prosedür

3.5.1. Dokuların Hazırlanması

Deney günü tartılan dokular 0,2 mM pH: 7,4 Tris-HCl tamponuyla homojenize edildi (IKA Ultra-Turrax T25 basic homogenizer, Germany). Doku MDA ölçümleri bu örneklerde yapıldı. Homojenat daha sonra 4000 rpm'de 55 dk santrifüj edildikten sonra üst kısımda yer alan temiz süpernatant kısım SOD, CAT ve GSH-Px ölçümleri için ayrıldı. SOD ölçümü için süpernatantlar eşit hacim etanol-kloroform (5/3, v/v)

karışımıyla ekstrakte edildi. Spektrofotometrik ölçümlerde uv-Shimadzu 1600 kullanıldı.

3.5.2. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Ölçümü

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) enzim aktivitesi Aebi'nin metoduna göre¹⁶⁰ H₂O₂'nin ortamdaki CAT tarafından tüketilmesi prensibine göre spektrofotometrik olarak 240 nm'de ölçüldü. 50 mM fosfat tamponuna hidrojen peroksit eklenerek 0,500 OD'ye tampon ayarlandı. Numune eklenmesiyle birlikte düşüş her 15 sn'de bir kaydedildi. 1 dakikada tüketilen H₂O₂ hızı olarak k/g protein olarak ifade edildi ($k = (2.3 \times \log (OD1/OD2)) / 30 \text{ sn}$).

3.5.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Ölçümü

SOD (SOD, EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi ölçümü nitroblue tetrazolium (NBT) ile ortaya çıkan O₂^{•-}'nin indirgenmesi esasına dayanılarak spektrofotometrede 560 nm'de ölçülerek değerlendirildi.¹⁶¹ Ortamda SOD enzimi bulunduğunda enzim miktarına bağlı olarak açık bir renk değişikliği meydana gelirken olmaması durumunda daha koyu renk vermektedir. Enzimin aktivitesini %50 oranında NBT redüksiyonunu inhibe eden enzim aktivitesi olarak alındı ve U/mg protein olarak ifade edildi (Enzimin % inhibisyonu = $(Abs_{k\ddot{o}r} - Abs_{num}) / Abs_{k\ddot{o}r} \times 100$).

3.5.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi Ölçümü

GSH-Px (GSH-Px, EC 1.11.1.9) enzim aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metodu uygulanarak H₂O₂ varlığında redükte glutasyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini katalizlemesi prensibine göre ölçüldü.¹⁶² NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de

spektrofotometrik olarak okunmasıyla enzim aktivitesi hesaplandı ve birim zamanda okside olan NADPH'ın mikromol miktarı U/mg protein olarak ifade edildi.

3.5.4. Tiyobarbitürük Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Miktarının Tayini

Esterbauer ve Cheeseman'ın metoduna göre asidik ortamdaki tiyobarbitürük asitin 90-95 °C'de reaksiyona girmesi prensibine göre spektrofotometrik olarak çalışıldı.¹⁶³ 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunan sonuçlar standart grafik sonuçlarına göre hesaplanarak nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

3.5.5. Protein Tayini

Süpernatant ve ekstrakte edilen örneklerde protein analizleri Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı.¹⁶⁴

3.5.6. Kreatin Kinaz ve Laktat Dehidrogenaz Enzim Düzeylerinin Ölçümü

Serum CK ve LDH enzim düzeyleri rutin biyokimya laboratuvarında otoanalizör kullanılarak belirlendi.

3.6. Histopatolojik İnceleme

Tüm gruptaki sıçanlardan alınan gastrokinemius kas dokuları etiket kod numaraları ve grup adları verilerek içinde %10'luk formaldehit bulunan ve ağzı sızdırmayan özel şişelere bırakıldı.

Bu amaçla alınan kas dokuları sırasıyla şu işlemlerden geçirildi;

1. Akarsuda yıkama; dokular temiz ve akar haldeki çeşme suyu altında gün boyu yıkandı.

Daha sonra dehidratasyon işlemi için dokular alkol serilerinden geçirildi. Bunun için ise şu işlem basamakları takip edildi;

2. %70'lik Etil Alkolde 1 gece (6-12 saat),
3. %80'lik Etil Alkolde 60 dakika,
4. %96'lık Etil Alkolde 60 dakika,
5. %96'lık Etil Alkolde 60 dakika,
6. %100'lük Absolute Etil Alkolde 60 dakika,
7. %100'lük Absolute Etil Alkol de 60 dakika bekletildi.

Dehidratasyon işleminin hemen ardından ksilen serilerinden geçirilen dokulara parlatma diğer adıyla şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Bu işlemler için;

8. Ksilende (Xylol) 30 dakika,
9. Yeni bir ksilende 30 dakika bekletildi,
10. Boncuk parafinde oda sıcaklığında (19-22 °C) 1 gece yani yaklaşık 6-12 saat bekletildi,
11. Boncuk parafinde 56-60 °C'lik etüvde 1 saat,
12. 56-60 °C'lik etüvde yeni hazırlanmış boncuk parafinde 2 saat bekletildi.
13. Son işlem olarak beyin dokuları etiketlenerek parafin blok kaplarına gömüldü ve soğuması için dolap ortamına kaldırıldı.

Elde edilen parafin bloklardan (Leica RM2125RT) mikrotomda beş mikron kalınlığında kesilerek, boyama işlemlerine hazır hale getirildi. Daha sonra kesitler, ışık mikroskobu düzeyinde incelenmek üzere Hematoksilen-Eozin (H-E) boyaları ile boyandı.

Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama Prosedürü:

Bu işlemler aşağıda sırasıyla verildi;

1. Ksilol'de 20 dk bekletildi.
2. Ksilol ve Ksilol'de 10 dk bekletildi.

3. %80'lik Alkolde 10 dk bekletildi.
4. İki ayrı %96'lık Alkol serisinde 5 dk bekletildi.
5. Kesitler çeşme suyunda yıkandı
6. Hematoksilen boyasında 1 dk bekletildi.
7. Asit-Alkol karışımına batırılıp çıkarıldı.
8. Eozin solüsyonunda 1 dk bekletildi.
9. Suda 1 dk yıkandı.
10. %80'lik Alkolde 10 dk bekletildi.
11. İki ayrı %96'lık Alkol serisinde 10 dk bekletildi.
12. Ksilol, Ksilol ve Ksilol serilerinde 20 dk bekletildi.
13. Entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

Kesitler boyama işlemlerinin ardından, incelemeye hazır hale gelen kesitler Olympus BH 40 marka kamera ataçmanlı ışık mikroskobu altında incelenerek ilgili tüm gruplara ait fotoğraflar çekildi.

İnfiltrasyonun bir göstergesi olarak, toplam lökosit sayısının histolojik olarak saptanmasında 5 µm kalınlığındaki kesitler kullanıldı. Kesitler hematoksin eosin (H-E) boyası ile rutin histolojik işlemlere uygun şekilde boyandı. Kas lökosit infiltrasyonunun kantifikasyonu Walden ve arkadaşları¹⁶⁵ tarafından uygulanan metod modifiye edilerek kullanıldı. Kas lökosit infiltrasyonu için bir kas kesiti (10x oküler ve 4x, 10x, 20x 40x objektif lens) 40, 100, 200 ve 400 defa büyütmede incelendi. Beş kesitin toplam görüntü alanı birlikte (0.25 mm^2 görünüm alanı) hesaplanarak toplam lökosit sayısı bulundu. Bu işlem ikinci bir seri kesit ile tekrarlandı ve ikisinin ortalaması alındı.¹⁶⁶

3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar Ort $\pm$ SEM şeklinde verildi. Verilerimize Non-Parametrik testlerden Kruskal-Wallis varyans analiz testi uygulandı. İstatistiksel açıdan fark görülen parametrelerde, Mann Whitney-U testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. $P<0.05$ anlamlı kabul edildi. Hesaplamalar Windows uyumlu SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

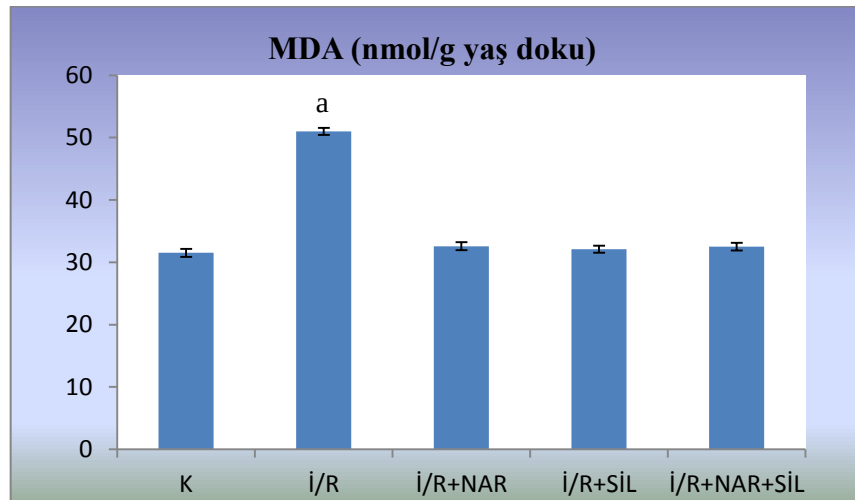
4.1. Sol Alt Ekstremitte Gastrokinemius Kası Biyokimyasal Parametreler

4.1.1. Malondialdehit (MDA)

Tablo 4.1 de Kontrol (K), iskemi reperfüzyon (İ/R), iskemi reperfüzyon ve naringin (İ/R+NAR), iskemi reperfüzyon ve silymarin (İ/R+SİL), iskemi reperfüzyon ve naringin ve silymarin (İ/R+NAR+SİL) gruplarına ayrılmış sıçanların gastrokinemius kası lipid peroksidasyon göstergesi olan malondialdehit'e (MDA) (nmol/g yaş doku) ait istatistik değerler sunulmuştur. İskemi reperfüzyon sol alt ekstremitteye uygulanmıştır. Sonuçlar Ort $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Tablo 4.1. Gruplara ait MDA düzeyleri (nmol/g yaş doku).

Gruplar (Ort $\pm$ SEM)				
K	İ/R	İ/R+NAR	İ/R+SİL	İ/R+NAR+SİL
(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
31.51 $\pm$ 0.63	50.99 $\pm$ 0.58	32.58 $\pm$ 0.63	32.1 $\pm$ 0.58	32.5 $\pm$ 0.61



Şekil 4.1. MDA düzeyleri.

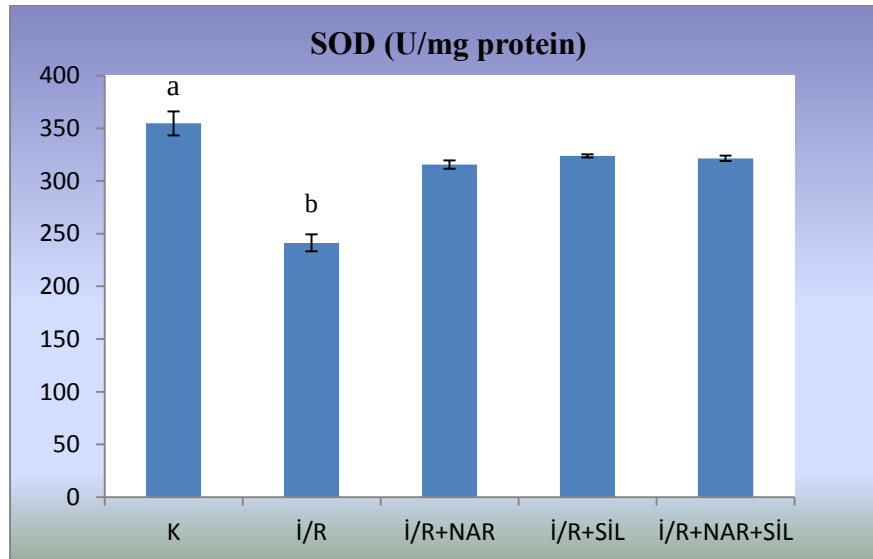
a: İ/R ile K, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL arasında, $p<0.01$

4.1.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Tablo 4.2 de K, İ/R, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL gruplarına ayrılmış sıçanların gastrokinemius kası serbest radikal süpürücü antioksidan enzim süperoksitdismutaz'a (SOD) (U/mg protein) ait istatistik değerler sunulmuştur. İ/R sol alt ektremiteye uygulanmıştır. Sonuçlar Ort $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Tablo 4.2. Gruplara ait SOD düzeyleri (U/mg protein).

Gruplar (Ort $\pm$ SEM)				
K	İ/R	İ/R+NAR	İ/R+SİL	İ/R+NAR+SİL
(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
354.79 $\pm$ 11.4	241.24 $\pm$ 8.11	315.51 $\pm$ 3.97	323.82 $\pm$ 1.49	321.45 $\pm$ 2.62



Şekil 4.2. SOD düzeyleri.

a: K ile İ/R ve İ/R+NAR arasında, $p < 0.01$

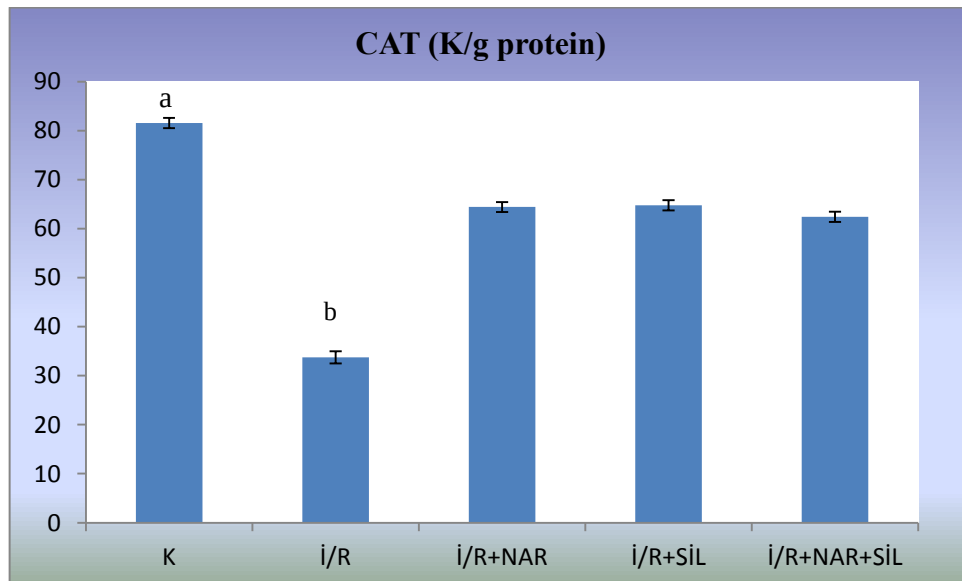
b: İ/R ile İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL arasında, $p < 0.01$

4.1.3. Katalaz (CAT)

Tablo 4.3 de K, İ/R, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL gruplarına ayrılmış sıçanların gastrokinemius kası serbest radikal süpürücü antioksidan enzim katalaz'a (CAT) (K/g protein) ait istatistik değerler sunulmuştur. İ/R sol alt ekstremiteye uygulanmıştır. Sonuçlar Ort± SEM olarak verilmiştir.

Tablo 4.3. Gruplara ait CAT düzeyleri (K/g protein).

Gruplar (Ort± SEM)				
K	İ/R	İ/R+NAR	İ/R+SİL	İ/R+NAR+SİL
(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
81.56±1.03	33.76±1.24	64.43±1.01	64.75±1.05	64.77±1.04



Şekil 4.3. CAT düzeyleri

a: K ile İ/R, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL arasında, $p<0.05$

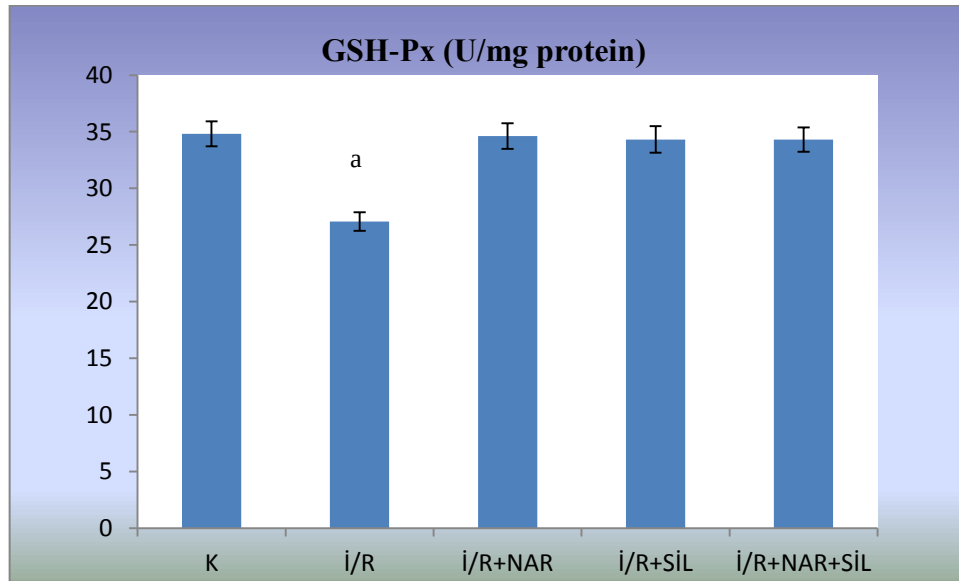
b: İ/R ile İ/R+NAR, İ/R+SİL, arasında, $p<0.05$

4.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Tablo 4.4 de K, İ/R, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL gruplarına ayrılmış sıçanların gastrokinemius kası serbest radikal süpürücü antioksidan enzim glutasyon peroksidaz'a (GSH-Px) (U/mg protein) ait istatistik değerler sunulmuştur. İ/R sol alt ekstremiteye uygulanmıştır. Sonuçlar Ort $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Tablo 4.4. Gruplara ait GSH-Px düzeyleri (U/mg protein).

Gruplar (Ort $\pm$ SEM)				
K	İ/R	İ/R+NAR	İ/R+SİL	İ/R+NAR+SİL
(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
34.82 $\pm$ 1.11	27.06 $\pm$ 0.82	34.62 $\pm$ 1.12	34.31 $\pm$ 1.17	34.3 $\pm$ 1.08



Şekil 4.4. GSH-Px düzeyleri.

a: İ/R ile K, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL, arasında, $p<0.05$

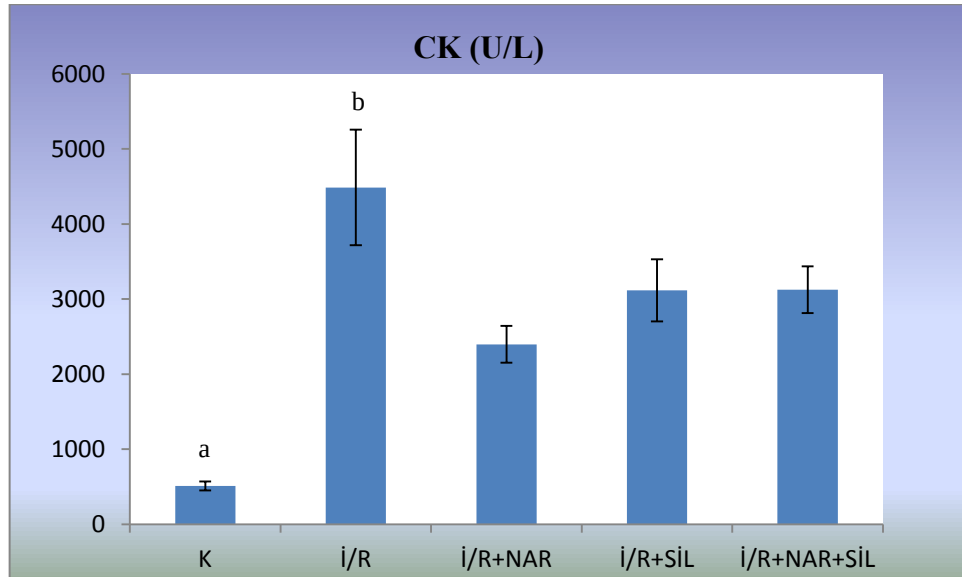
4.2. Serum Biyokimyasal Parametreler

4.2.1. Kreatin Kinaz (CK)

Tablo 4.5 de K, İ/R, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL gruplarına ayrılmış sıçanların oksidatif strese bağlı kas hasarı göstergelerinden biri olan keratin kinaz'a (CK) (U/L) ait istatistik değerler sunulmuştur. İ/R sol alt ekstremiteye uygulanmıştır. Sonuçlar Ort $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Tablo 4.5. Gruplara ait CK düzeyleri (U/L).

Gruplar (Ort $\pm$ SEM)				
K	İ/R	İ/R+NAR	İ/R+SİL	İ/R+NAR+SİL
(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
509 $\pm$ 60.63	4485.75 $\pm$ 768.64	2396.38 $\pm$ 246.07	3115.88 $\pm$ 412.34	3123 $\pm$ 312.26



Şekil 4.5. CK düzeyleri.

a: K ile İ/R, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL arasında, $p < 0.01$

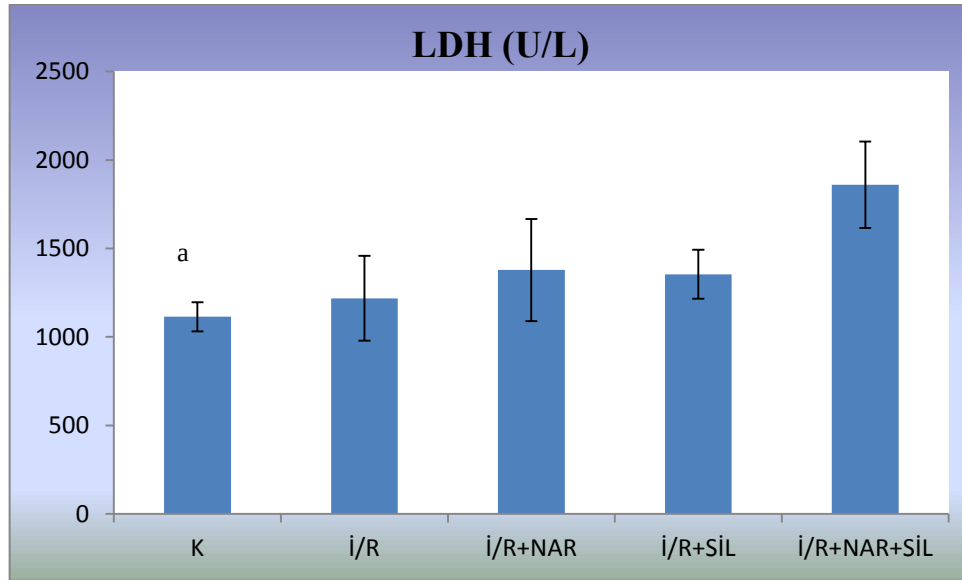
b: İ/R ile İ/R+NAR arasında, $p < 0.05$

4.2.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH)

Tablo 4.6 da K, İ/R, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL gruplarına ayrılmış sıçanların laktat dehidrogenaz'a (LDH) (U/L) ait istatistik değerler sunulmuştur. İ/R sol alt ekstremiteye uygulanmıştır. Sonuçlar Ort $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

Tablo 4.6. Gruplara ait LDH düzeyleri (U/L).

Gruplar (Ort $\pm$ SEM)				
K	İ/R	İ/R+NAR	İ/R+SİL	İ/R+NAR+SİL
(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
1114.13 $\pm$ 81.89	1218.38 $\pm$ 239.74	1378.38 $\pm$ 288.9	1353.63 $\pm$ 138.46	1860.25 $\pm$ 243.93



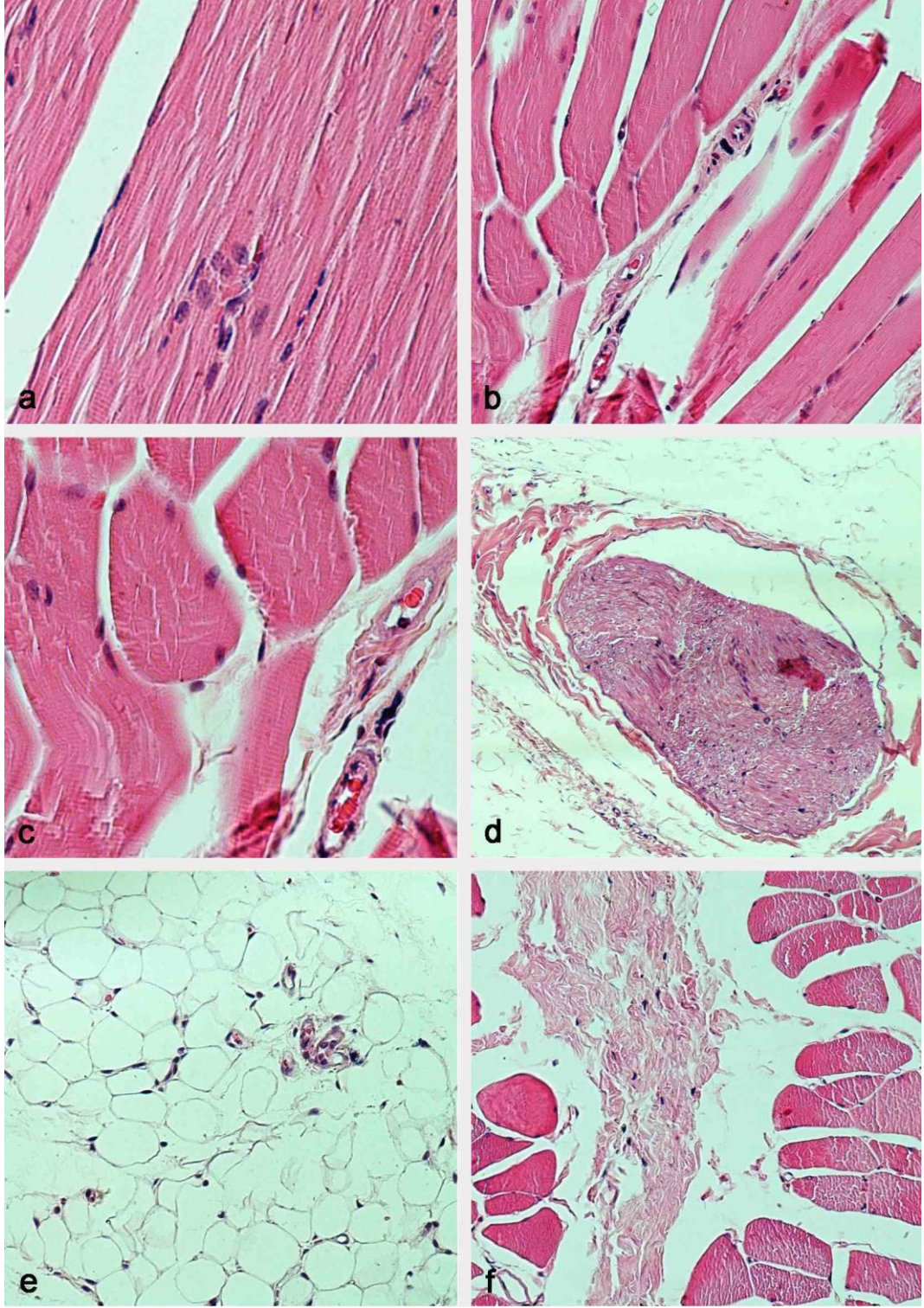
Şekil 4.6. LDH düzeyleri.

a: K ile İ/R+NAR+SİL grubu arasında, $p < 0.05$

4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Kontrol Grubu Bulguları

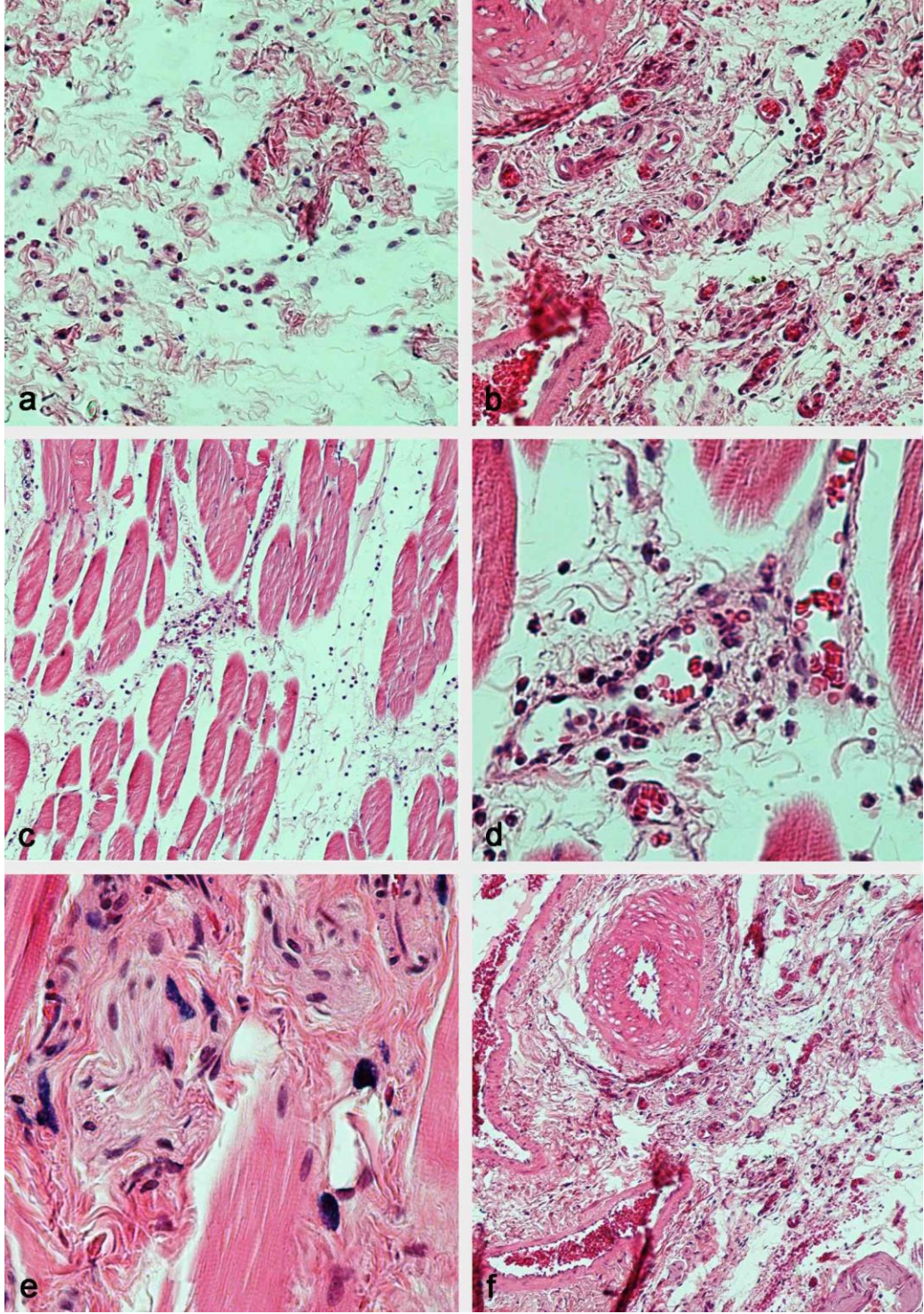
K grubunda çizgili kas liflerinin yapısı normal olarak değerlendirildi. Çekirdekleri periferde yerleşim gösteren kas liflerinin bütünlüğü vardı. A ve I bandlarının oluşturduğu çizgilenme belirgindi (şekil 4.7.a). Perimisyumda gözlenen arteriyol ve venüllerin damar yapısı normaldi (Şekil 4.7.b). Damarların endoteli belirgin bir şekilde gözlenmekteydi (Şekil 4.7.c). Periferik sinirlerde herhangi anomali gözlenmez (Şekil 4.7.d) iken sinirlerin etrafında bulunan bağ ve yağ doku (Şekil 4.7.e) normaldi. Perimisyumda ise yoğun kollajen liflerin arasında seçilebilen bağ doku hücreleri normal (Şekil 4.7.f) görünümlü idi.



Şekil 4.7. K grubuna ait deneklerin gastrokinemiyus kası ışık mikroskopik görünümeleri. a. Çizgili kas genel görünümü (Çizgilenme - 40X). b. Perimisyumda yerleşik damarların görünümü (20X). c. Arteriyol damar endoteli genel görünümü (40X). d. Periferik sinir görünümü (10X). e. Epimisyum ve yağ dokunun genel yapısının görünümü (20X). f. Normal görünümlü perimisyum ve bağ doku hücreleri (20X). (Kesit 5 µm, Boya: H-E).

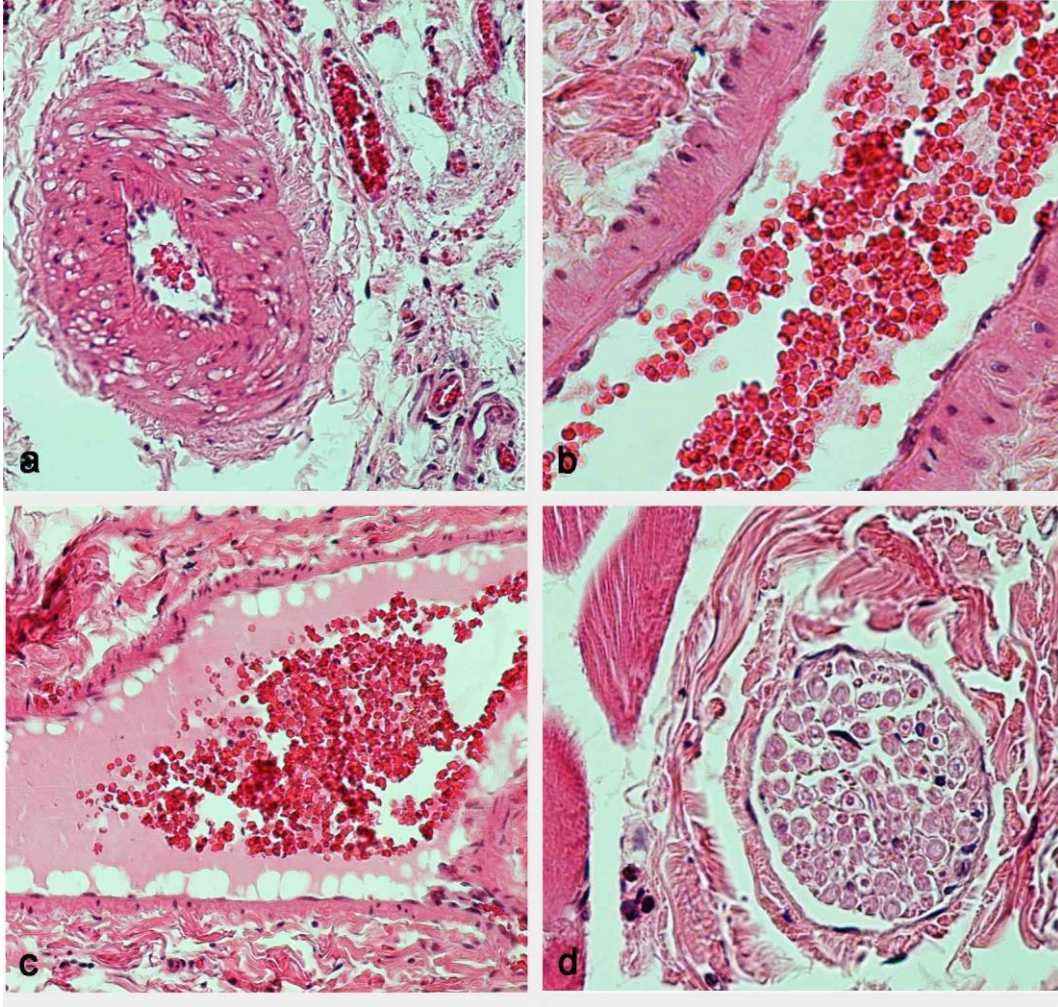
4.3.2. İskemi/Reperfüzyon Grubu Bulguları

Epimisyumda kollajen liflerin ipliksi düzeni bozulmuş ve kollajen lifler arasında çok yoğun bir bağ doku hücresi artışı (Şekil 4.8.a) dikkati çekmekteydi. Kan damarlarından (arteriyol, venül ve kapilerden) epimisyumda yoğun bir lökosit göçü (Şekil 4.8.b) olduğu fark edilmekteydi. Benzer durum perimisyum içinde görülmekteydi. Perimisyumda kollajen liflerin ipliksi düzeni bozulmuş ve kollajen lifler arasında çok yoğun bir bağ doku hücresi artışı (Şekil 4.8.c) olduğu gözlenmekteydi. Kan damarlarından (arteriyol, venül ve kapilerden) perimisyumda yoğun bir lökosit göçü (Şekil 4.8.d) olduğu izlenmekteydi. Ayrıca sitoplazması bazofilik boyanan ve çekirdeği maskeleyen halde olan bağ doku (mastosit) (Şekil 4.8.e) hücreleri dikkat çekiciydi. Bunun yanı sıra damarlarda bir dilatasyon ve arterlerin duvar yapısında bir bozulma (Şekil 4.8.f) söz konusu idi. Musküler arterlerin tunika media tabakasını meydana getiren düz kas hücrelerinde spongiyotik (Şekil 4.9.a) bir görünüm vardı. Arterlerde olan bu anomali venlerde gözlenmedi (Şekil 4.9.b). Bazı büyük venlerde koagülasyon (Şekil 4.9.c) varlığı tespit edilmekteydi. Periferik sinirler de bir dejenerasyon (Şekil 4.9.d) varlığı gözlenmekteydi.



Şekil 4.8. İ/R grubuna ait deneklerin gastrokinemiyus kası ışık mikroskopik görünümleri

a. Epimisyumda kollajen liflerin ve bağ doku hücresi artışının görünümü (20X). b Epimisyumda kan damarlarının (arteriyol, venül ve kapillerin) görünümü (20X). c. Perimisyumda hasar ve yoğun hücresel artışın görünümü (10X). d. Perimisyumda damarlarda gözlenen dilatasyonun ve kası lifleri arasında görülen lökosit hücreleri (40X). e. Kası lifleri arasında görülen mastosit ve fibroblast hücreleri (40X). f. Epimisyumda yerleşik arterlerin duvar yapısında bir bozulmanın görünümü (10X). (Kesit 5 μ m, Boya: H-E).

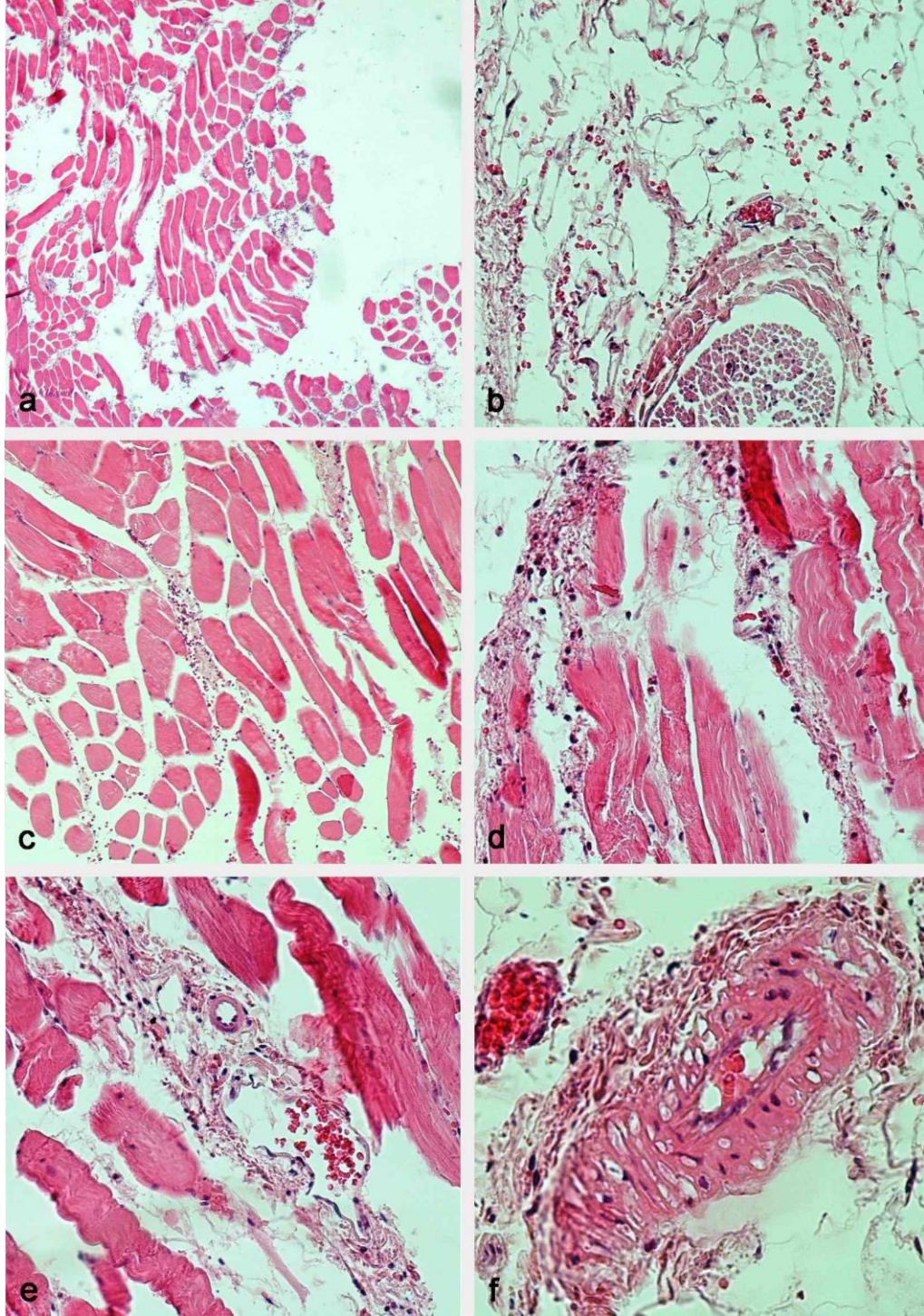


Şekil 4.9. İ/R grubuna ait deneklerin gastrokinemiyus kası ışık mikroskopik görünümleri

a. Arterlerin duvar yapısında bir bozulmanın yakından görünümü (20X). b Epimisyumda yerleşik venlerin duvar yapısının yakından görünümü (40X). c. Bazı venlerde koagulasyon görünümü (20X). d. Periferik sınırlar (40X). (Kesit 5 µm, Boya: H-E).

4.3.3. İskemi/Reperfüzyon ve Naringin Grubu Bulguları

Epimisyum (Şekil 4.10.b) ve perimisyumda kollajen liflerin iplikli düzeni bozulmuş ve kollajen lifler arasında çok yoğun bir bağ doku hücresi artışı (Şekil 4.10.c; Şekil 4.10.d) dikkati çekmekteydi. Kan damarlarından (arteriyol, venül ve kapilerden) epimisyum ve perimisyuma yoğun bir lökosit göçü (Şekil 4.10.e) olduğu fark edilmekteydi. Muskuler arterlerin tunika mediya tabakasını meydana getiren düz kas hücrelerinde spongiyotik (Şekil 4.10.f) bir görünüm vardı.

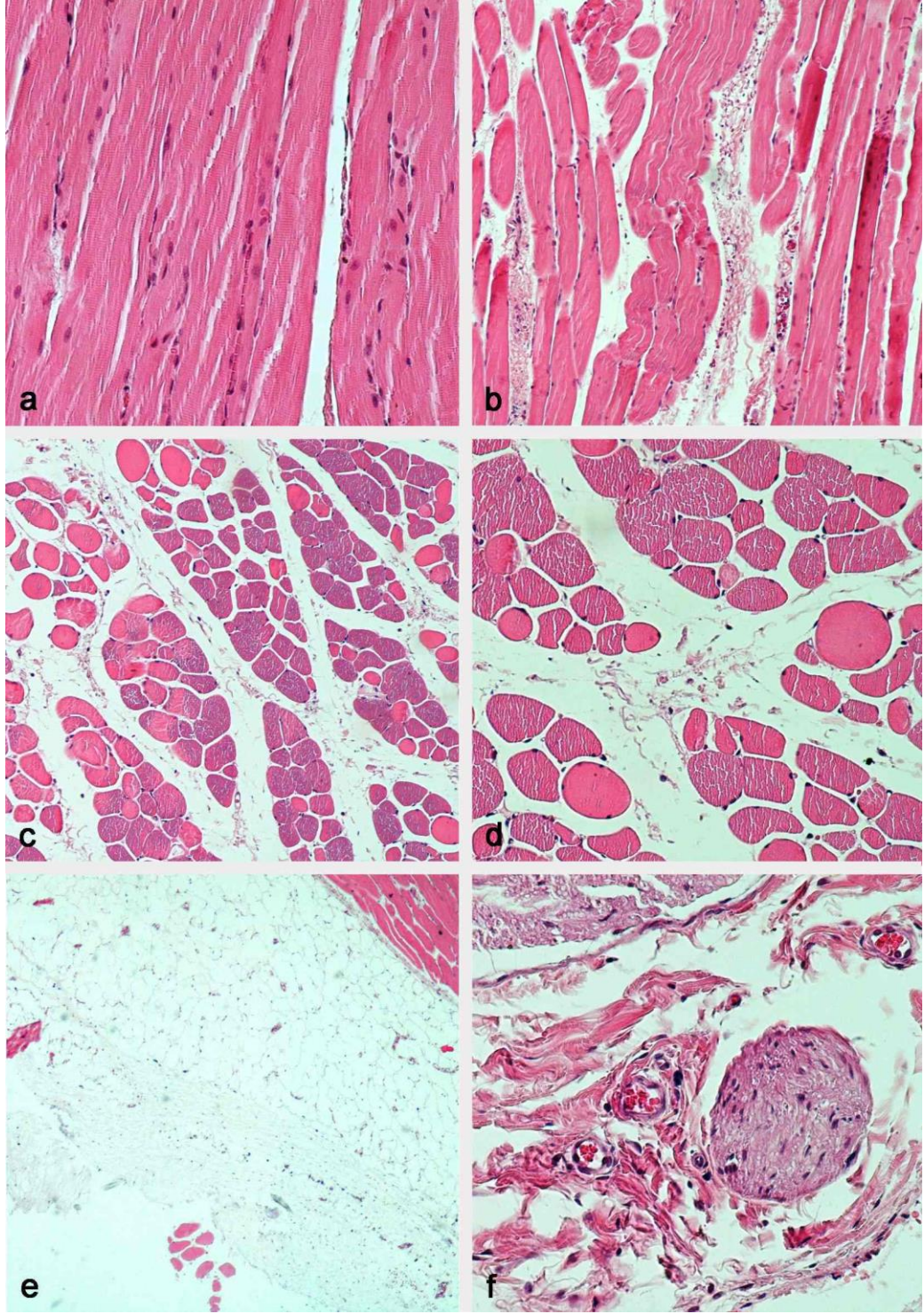


Şekil 4.10. İ/R+NAR grubuna ait deneklerin gastroknemiyus kası ışık mikroskopik görünümüleri

a. Gastroknemiyus kası genel görünümü (4X). b Epimisyumda damarda dilatasyon ve hücresel artışın görünümü (10X). c. Perimisyumda bağ dokudaki kollajen ve hücresel artışının görünümü (10X). d. Perimisyumda bağ dokudaki kollajen ve hücresel artışının yakından görünümü (20X). e. Epimisyumda damarda dilatasyon ve hücresel artışın yanında kası lifleri arasında görülen lökosit hücreleri (20X). f. Muskuler arterlerin tunika mediya tabakasını meydana getiren düz kas hücrelerinde spongiyotik görünüm (40X). (Kesit 5 µm, Boya: H-E).

4.3.4. İskemi/Reperfüzyon ve Silymarin Grubu Bulguları

Genel olarak kas lifleri bütünlüğünü korur ve çizgilenme belirgin (Şekil 4.11.a) iken aradaki bağ dokuda yani perimisyumda hafif bir kollajen ve hücresel artışın (Şekil 4.11.b) olduğu gözlenmekteydi. Epimisyumda yer alan kan damarlarında çizgili kas liflerinin enine kesitlerinde sitoplazmanın yer yer daha bazofilik (Şekil 4.11.c) boyandığı ve bazı liflerinin ise diğerlerinden farklı olarak daha eozinofilik (Şekil 4.11.d) boyandığı görülmekteydi. Kas dokunun etrafını saran bağ ve yağ dokuda (Şekil 4.11.e) bir anomali fark edilmezken periferik sinirler (Şekil 4.11.f) normal görünümlü idi.

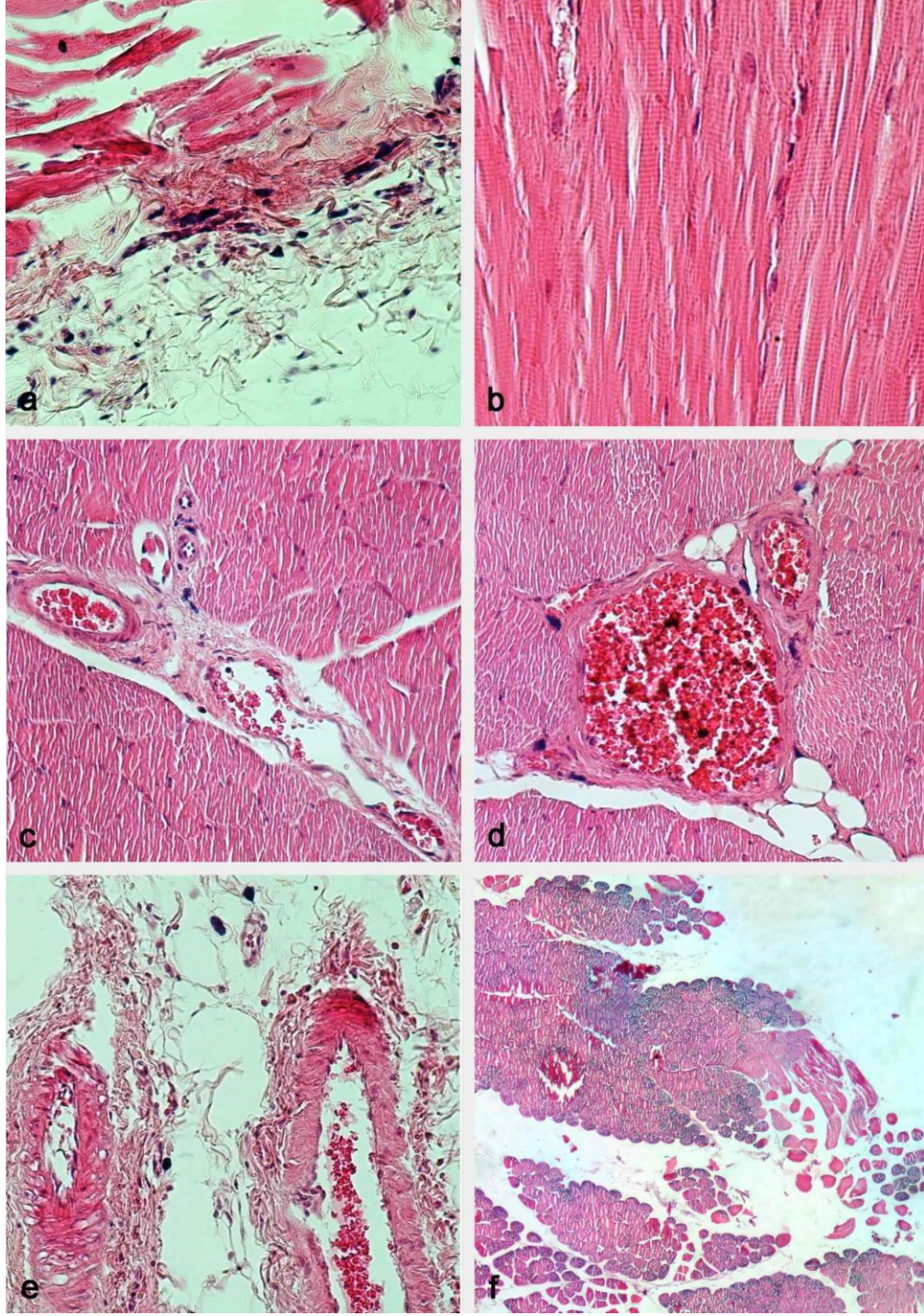


Şekil 4.11. İ/R+SİL grubuna ait deneklerin gastroknemiyus kası ışık mikroskopik görünümleri

a. Gastroknemiyus kası genel görünümü (20X). b Perimisyumda hafif bir kollajen ve hücresel artışın görünümü (10X). c. Bazı kas liflerinin bazofilik ve asidofilğin küçük görünümü (10X). d. Bazı kas liflerinin daha fazla asidofilğin yakından görünümü (20X). e. Kas dokunun etrafını saran bağ ve yağ dokunun görünümü (4X). f. Epimisyumda yerleşik damar ve sinirlerin genel görünümü (20X). (Kesit 5 μ m, Boya: H-E).

4.3.5. İskemi/Reperfüzyon ve Naringin ve Silymarin Grubu Bulguları

Perimisyumda bağ doku liflerinin arasında sitoplazması bazofilik boyanan bağ doku (mastosit) (Şekil 4.12.a) hücreleri dikkat çekiciydi. Kas liflerindeki A ve I bandlarının oluşturduğu çizgilenme belirgin olmakla birlikte (Şekil 4.12.b), damarlarda bir dilatasyon ve arterlerin duvar yapısında bir bozulma (Şekil 4.12.c; Şekil 4.12.d) söz konusu idi. Bazı arterlerin tunika mediya tabakasını meydana getiren düz kas hücrelerinde spongiyotik (Şekil 4.12.e) yapılar görülmekteydi. Arterlerde olan bu anomali venlerde gözlenmedi. Kas liflerinin enine kesitlerinde sitoplamanın yer yer daha bazofilik (Şekil 26.f) boyandığı ve bazı liflerinin ise diğerlerinden farklı olarak daha eozinofilik boyandığı gözlenmekteydi.



Şekil 4.12. İR+SİL+NAR grubuna ait deneklerin gastroknemiyus kası ışık mikroskopik görüntüleri.

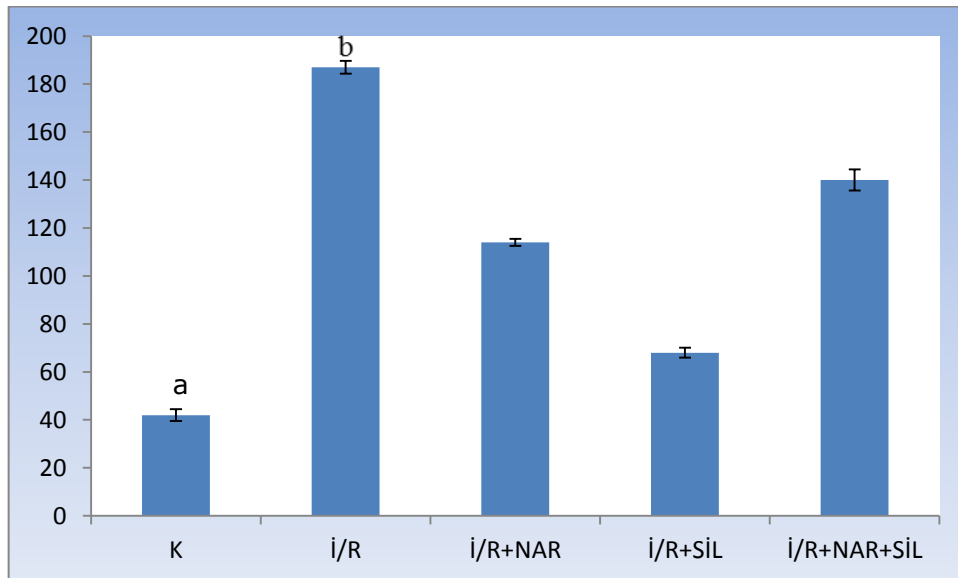
a. Perimisyumda bağ doku liflerinin arasındaki mastositlerin görünümü (20X). b Çizgili kas genel görünümü (Çizgilenme - 20X). c. Damarlardaki dilatasyonun görünümü (10X). d. Damarlarda bir dilatasyon ve arterlerin duvar yapısında bir bozulmanın görünümü (20X). e. Bazı arterlerin tunika mediya tabakasını meydana getiren düz kas hücrelerinde spongiyotik görünümü (20X). f. Bazı kas liflerinin bazofilik ve asidofilik küçük görünümü (4X). (Kesit 5 µm, Boya: H-E).

4.3.6. Gastrokinemius Kası Lökosit İnfiltrasyonu

Tablo 4.7 de sıçanların gastrokinemius kasındaki lökosit infiltrasyonu (alandaki ortalama lökosit sayıları) sonuçları sunulmuştur. Sonuçlar Ort $\pm$ SEM olarak verildi. Gruplar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı, $p < 0.05$ ise anlamlılık düzeyi kabul edildi.

Tablo 4.7. Sıçanların gastrokinemiyus kası lökosit infiltrasyonu istatistik sonuçları.

Gruplar	Ort $\pm$ SEM
Kontrol (n=8)	42 $\pm$ 2.41
İ/R (n=8)	187 $\pm$ 2.68
İ/R+NAR (n=8)	114 $\pm$ 1.52
İ/R+SİL (n=8)	68 $\pm$ 2.10
İ/R+NAR+SİL (n=8)	140 $\pm$ 4.43



Şekil 4.13. Sıçanların gastrokinemiyus kasındaki lökosit infiltrasyonu (ortalama lökosit sayıları/0.25 mm²).

a: K ile İ/R arasında, $p < 0.05$

b: İ/R ile İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL, arasında, $p < 0.05$

Tablo 4.8. Rat gastrokne Miyus kası için histopatolojik değerlendirme skoru. Deneklerden elde edilen kesitler ışık mikroskop kullanılarak semi-quantitatively olarak değerlendirilerek skorlandı.

Gruplar					
	K	İ/R	İ/R+NAR	İ/R+SİL	İ/R+NAR+SİL
Epimisyumda bozulma	-	+++	++	+	++
Perimisyumda bozulma	-	+++	++	+	++
Perimisyumda hücre sel artış	-	+++	++	++	+++
Arter duvarında dejenerasyon	-	+++	++	+	+++
Damarlarda dilatasyon	-	+++	+	+	++
Venlerde koagulasyon	-	++	-	-	-
Yok/Normal = -; Hafif = +; Orta = ++; Şiddetli = +++					

Tablo 4.8 değerlendirildiğinde İ/R uygulanan grupta epimisyum ve perimisyumda önemli oranda bozulma gözlenmekteyken özellikle İ/R+SİL grubunda hafif ve İ/R+NAR grubu ile İ/R+NAR+SİL gruplarında bozulma derecesinin orta düzeyde olduğu görölmektedir. Yine İ/R uygulanan grupta perimisyumda şiddetli hücre sel artış gözlenmekteyken SİL ve NAR gruplarında orta derecede hücre sel artış görölmektedir. Arter duvarında meydana gelen dejenerasyona bakıldığında İ/R grubunda dejenerasyon önemli oranda gözlenmekte ancak İ/R+SİL grubunda dejenerasyonun hafif şekilde gerçekleştiği görölmektedir. Ayrıca damarlarda dilatasyon derecesi İ/R grubunda şiddetli İ/R+NAR+SİL grubunda orta ancak İ/R+SİL ve İ/R+NAR gruplarında hafif derecede olduğu görölmektedir. Son olarak venlerde koagulasyon İ/R grubunda orta fakat İ/R+NAR, İ/R+SİL ve İ/R+NAR+SİL gruplarında normal düzeyde değerlendirilmektedir.

5. TARTIŞMA

Çizgili kas İ/R hasarı hastaların morbiditesini olumsuz yönde etkileyen klinik bir durumdur. Bundan dolayı bu olayın negatif sonuçlarını azaltmak amacıyla yeni ilaçların geliştirilmesi önem arz etmektedir. Turnike uygulaması, bazı ameliyatlarda, ameliyat bölgesinde mümkün olduğunca kansız bir ortam sağlamak ve böylece cerrahın çalışmasını kolaylaştırmayı amaçlayan bir yöntemdir. Ancak bu yöntemin İ/R hasarına yol açabilme gibi bir sakıncası vardır. Bununla ilgili olarak, turnike süresince dokuda gelişecek olası hasarı azaltarak hastayı koruyacak ilaçların uygulanması faydalı bir yaklaşım olacaktır. Bu nedenle, bu çalışmada antioksidan kapasitelere sahip maddeler sıçan İ/R hasarı modelindeki olası yararlı etkilerinin araştırılması planlandı.

İskelet kası iskemiye karşı diğer dokulardan daha dayanıklıdır. Ortopedik cerrahide, uzamış turnike süresi, arter yaralanmalı ekstremit travması, rekonstrüktif mikrocerrahi akut kompartman sendromu sık karşılaşılan iskemik durumlardandır.^{167, 168} İskemik durumlarda temel amaç, erken reperfüzyonu sağlayarak kas nekrozunu önlemektir. Bununla birlikte, reperfüzyonun kendisi “reperfüzyon hasarı” olarak adlandırılan fizyopatolojiye yol açmaktadır.¹⁶⁸ İskemi sonrası doku hasarı, çoğunlukla reperfüzyon sırasında oluşur.¹⁶⁹ Reperfüzyon, iskemik dokularda nötrofillerin birikimine ve endotel hücrelerinde KO aktivitesinin artmasına neden olur ki, bu olaylar, $O_2^{\bullet}$, H_2O_2 ve $OH^{\bullet}$ olarak bilinen SOR’ların hızlı bir şekilde üretimine yol açar. Bu serbest radikaller, İ/R modellerinde^{168, 170-172} gösterildiği gibi iskelet kası, endotel ve diğer hücrelerde toksik etkiye sahiptir.^{168, 169} İskelet kası İ/R süresince oluşan SOR’lar kas kontraksiyonunun onarılması, kas nekrozu, endotelial hücre şişmesi, hücresel proteinlerin serbestleşmesi ve proteinlere karşı mikrovasküleritenin artışı içeren çok sayıda özelliğe sahiptir.^{173, 174}

Elbette akut ekstremité iskemisi ile birlikte ekstremitenin yeniden kanlanması şiddetli lokal doku hasarı ve sistemik komplikasyonları beraberinde getirmektedir. Bununla ilişkili olarak ölüm oranı %25-50, amputasyon ise %15-40 olarak belirtilmiştir.¹⁷⁵ Bunun nedeni ise yukarıda belirtildiği üzere doğrudan iskeminin kendisinden çok reperfüzyon sırasında oluşan toksik metabolitlerdir. İskemi sonrası reperfüzyon olması ve dokulara moleküler O₂'nin hızla ulaşması ile beraber SOR'lar oluşmaktadır. Oluşan SOR'lar hasarlanmış hücre membranındaki yağ asit radikalleri ile reaksiyonu lipid peroksidasyonuna yol açar ve MDA seviyeleri¹⁰ hücre membranı lipidleri peroksidasyonunun bir ürünü olarak artar, bunun ölçümü, oluşan serbest radikal miktarının bir göstergesidir.¹⁷⁴ Ayrıca endojen TNF, IL-8, elastaz ve antitripsin seviyelerinde artış ile nötrofil ve makrofaj aktivasyonuna sekonder olarak neden olur.¹⁷⁶ Sonuçta majör organlarda mikrovasküler endotel hasarına bağlı geçirgenlik artışı, trombosit agregasyonu ve nekroz alanları oluşmaktadır. Öte yandan Hardy ve arkadaşlarının¹⁷⁷ akut alt ekstremité iskemisi modelinde, reperfüzyon sonrası düşük reflow'un sebebi iskemiyeye bağlı vazokonstriksiyon, nötrofil agregasyonu, endotel kaynaklı relaksan faktörün O₂ radikalleri tarafından ortadan kaldırılmasıdır. Bu noktada SOR'ların etkisini azaltmada enzimatik süpürücülerden SOD, KO inhibitörleri, nonenzimatik süpürücülerden demir şelatörleri, mannitol, dimetilüre, dimetil sulfoksit, ve ayrıca intraselüler antioksidan sistemlerden oltipraz ve glutatyon sistemleri sayılabilir.¹⁷⁸ "Oksidatif stres" sırasında ortaya çıkan SOR'lar; kas fibrillerinin kasılma ve organizasyonunun bozulmasına, dejenerasyonuna, nekrozuna; vasküler endotel hücre şişmesine ve mikrovasküler geçirgenliğin artmasına yol açarak, hücresel proteinlerin salınımı ve bu proteinlerin damar dışına kaçışına neden olurlar.^{170, 171, 174} Ayrıca, serbest radikaller, doku protein yapılarında da oksidasyona neden olurlar ve bu doku protein hasarı, P ölçümü ile ortaya konulabilir. NO, kardiyovasküler, nöral ve immün sistem

fonksiyonları üzerinde düzenleyici etkisi olan nispeten reaktif olmayan bir serbest radikaldır.¹⁷⁹ Savunma sisteminde antioksidan ve prooksidanlar arasındaki dengenin bozulması nedeniyle veya antioksidanların tükenmesi ve/veya SOR üretilmesi sonucu hücre veya dokularda oksidatif stres oluşmasına neden olur. Dokularda oluşan SOR enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistem tarafından etkili bir şekilde süpürülür. Antioksidan enzim aktivitesinde azalma lipid peroksidasyonu indüksiyonuyla yakın ilişkilidir.

Alt ekstremitte İ/R hasarının, klinik modelde incelenmesi güçtür. Bundan dolayı çalışmalarda hayvan modelleri kullanılmaktadır. Ancak seçilen model, modeldeki iskeminin derinliği ve süresi sonuçların değerlendirilmesi bakımından çok önemlidir. Yeterince derin bir iskemi oluşturulmadığında reperfüzyon hasarının önlenmesi de anlamlı olmayacaktır. Wehrens; sıçanların ekstremitelerdeki kollateral dolaşımının, insanlardaki ile analog olması bakımından insandaki klinik soruna en yakın, devamlı ve derin iskemiye ancak femoral akım ile birlikte kollateral dolaşımının da engellenmesi ile ulaşılabileceğini bildirmiştir. Çünkü, iskemik periyod uzadıkça dokunun oksijensiz kalmasının vereceği hasar reperfüzyon hasarını kat kat geçmekte, doku nekrozu ve hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır.¹⁸⁰

Biz çalışmamızı, kritik iskemi süresini dikkate alarak 2 saatlik ve ekstremitenin olabildiğince proksimalinden femoral arter ve kollaterallerinde oklüzyonunu sağlayarak derin alt ekstremitte iskemisi oluşturduğumuz rat modelinde uyguladık ve iskemiye takip eden reperfüzyon sürecinin sona ermesi ile kas dokusunda SOD, GSH-Px, CAT, MDA ve serumda LDH ve CK olmak üzere altı parametrenin ölçümü ile gerçekleştirdik.

Oksidatif strese karşı SOD, CAT, GSH-Px ve GSH gibi SOR'lar temel savunma sistemleridir. Rajadural ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada naringin kullanımına bağlı

olarak SOD ve CAT aktivitelerinin arttığı bildirilmektedir.¹⁸¹ Özyurt ve arkadaşlarının¹⁷¹ yaptıkları iskelet kası İ/R çalışmasında reperfüzyon sonrası kas dokusunda SOD ve CAT antioksidan enzim aktiviteleri yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda reperfüzyon sonrası İ/R+NAR, İ/R+SİL ve İ/R+NAR+SİL grublarındaki kas dokularında SOD, GSH-Px ve CAT antioksidan enzimlerin aktivitesinde İ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edildi. Reperfüzyon sonrası antioksidan enzimlerdeki bu artış; İ/R olayında aşırı üretilen SOR'ların, antioksidan savunma sistemini uyarması ve kullanılan antioksidan özellikte ilaçların, antioksidan enzimler olarak bilinen CAT, SOD ve GSH-Px'ın olasılıkla ekspresyonlarında artışa neden olarak, antioksidan savunma sistemini güçlendirmektedir. Böylece, reperfüzyon sonrası iskelet kasında oluşan yüksek miktardaki serbest radikalleri detoksifiye etmek için vücudun oluşturduğu kompensatuvar bir mekanizma ve verdiğimiz ilaçlar ile daha fazla antioksidan enzim üretimi gerçekleşmektedir ve bu sonuç, Özyurt ve arkadaşlarının¹⁷¹ iskelet kası İ/R çalışmasıyla desteklenmektedir.

Flavonoidlerin çoğunluğunda olduğu gibi naringin, metal şelasyonu, antioksidan ve serbest radikal süpürücü özelliklere^{123, 182} ve mutajenlere¹⁸³ ve lipid peroksidasyonuna karşı bazı koruyucu etkilere sahiptir. Naringinin, GSH ve başka diğerleri gibi antioksidan etkilerinin bulunduğu gösterilmiş, lipid peroksidasyonunu başlatan H₂O₂'i inhibe ettiği bildirilmiştir.¹⁸⁴ Son dönemde naringinin GSH-Px, SOD ve CAT' in gen ekspresyonunu düzenleyerek CAT ve SOD aktivitelerini arttırıp antioksidatif kapasitenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır.¹⁸⁵ Bu etkilerin bütünü naringinin in vivo olarak rat iskelet kasında oksidatif hasara yol açan İ/R'yi azaltma yeteneğine katkıda bulunmuş olabileceğini göstermektedir.

Savunma sisteminde antioksidan ve prooksidanlar arasındaki dengenin bozulması nedeniyle veya antioksidanların tükenmesi ve/veya SOR üretilmesi sonucu

hücre veya dokularda oksidatif stres gelişime neden olur. Dokularda oluşan SOR enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistem tarafından etkili bir şekilde süpürülür. Antioksidan enzim aktivitesinde azalma lipit peroksidasyonu indüksiyonuyla yakın ilişkilidir. Oksidatif strese karşı SOD, CAT, GSH-Px ve GSH gibi SOR'lar temel savunma sistemleridir. Rajadural ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada naringin kullanımına bağlı olarak SOD ve CAT aktivitelerinin arttığı bildirilmektedir.¹⁸¹

Chander ve arkadaşları renal İ/R hasarı oluşturdukları çalışmalarında 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda naringin uygulamasıyla lipit peroksidasyonu ürünü MDA düzeylerini değerlendirmişler ve 400 mg/kg naringin uygulanan grupta MDA düzeyi 100 ve 200 mg/kg MDA düzeyine göre daha fazla düştüğünü bildirmektedirler.¹⁸⁶ Ve yine Singh ve arkadaşları yaptıkları İ/R çalışmalarında 400 mg/kg dozunda Naringin uygulamasıyla lipit peroksidasyonu ürünü olan MDA düzeyinin İ/R grubunda oldukça yüksek iken Naringinli tedavi grubunda K'ya yaklaşarak düştüğü bildirilmiştir.¹³³ Benzer bir etki insanlarda yapılan klinik bir çalışmada da tespit edilmiştir: M.vastus lateralis'ten alınan örneklerde MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.¹⁸⁷ Gürsul C. yaptığı deneysel İ/R modelinde 2 saat iskemi 2 saat reperfüzyon uygulamış ve doku MDA düzeyinin İ/R grubunda K grubuna göre anlamlı derecede yükseldiğini bildirmektedir.¹⁸⁸ Çalışmamızda ve diğer İ/R çalışmalarında olduğu gibi,^{170, 171} iskelet kası reperfüzyon hasarının bir göstergesi olarak kas dokusunda MDA, seviyesinin arttığı gözlemlendi. Bulgularımız literatür ile uygunluk göstermiş olup çalışmamızda İ/R+NAR tedavi grubunda MDA düzeyinin İ/R grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düştüğü görülmüştür. İ/R+SİL grubunda MDA düzeyinin K grubuna yaklaştığı İ/R grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Yine İ/R grubunda reperfüzyon hasarı ile şekillenen membran lipitlerinin peroksidasyonu ürünü olan MDA'nın K grubuna göre istatistiksel olarak

anlamalı düzeyde yüksek olduğu ve İ/R+NAR+SİL tedavi grubu istatistiksel olarak anlamalı şekilde düştüğü tespit edildi.

Çalışmamızda SOD enzim aktivitesinin İ/R grubunda K grubuna göre anlamalı oranda azalma gösterdiği tespit edildi. 6 saat iskemi ve 4 saat reperfüzyonun uygulandığı alt ekstremitte turnike modelinde SOD aktivitesinin İ/R grubunda K grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir.¹⁸⁹ 4 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyonun uygulanan başka bir alt ekstremitte turnike iskemi modelinde SOD enzim aktivitesinin K grubuna göre anlamalı derecede azaldığı tespit edilmiştir.¹⁹⁰ Gürsul C. Yaptığı İ/R çalışmasında 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uyguladığı deneysel çalışmasında SOD düzeylerinin İ/R grubunda K grubuna göre azalma gösterdiğini bildirmektedir.¹⁸⁸ Chander ve arkadaşları ratlarda renal İ/R hasarı oluşturdukları çalışmalarında 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarda naringin uygulamasıyla SOD düzeylerini değerlendirmişler ve 100 ve 200 mg/kg dozları uygulanan gruplara göre SOD düzeyi daha az ancak 400 mg/kg doz uygulanan grupta daha fazla yükseldiğini bildirmektedirler.¹⁸⁶ Ve yine Singh ve arkadaşları yaptıkları 45 dakika iskemi 24 saat reperfüzyon uyguladıkları renal İ/R çalışmasında 400 mg/kg dozunda Naringin uygulamasıyla İ/R grubunda K grubuna göre düşen SOD, düzeylerinin Naringinli tedavi grubunda yükseldiği ve lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA düzeyinin ise İ/R grubunda oldukça yüksek iken Naringinli tedavi grubunda K'ya yaklaşarak düştüğü bildirilmiştir.¹³³ Bulgularımız literatür ile uygunluk göstermiş olup çalışmamızda İ/R+NAR grubunda SOD düzeyi İ/R grubuna göre anlamalı oranda yükseldiği görülmüştür. İ/R+SİL grubunda SOD düzeyinin K grubuna yaklaştığı İ/R grubu ile arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamalı olduğu görüldü. Yine İ/R grubunda İ/R'ye bağlı olarak oluşan serbest radikallerin süpürülmesinde rol alan SOD düzeyinin K'ya göre istatistiksel olarak

anlamli düzeyde yüksek olduğu ve İ/R+NAR+SİL tedavi grubu istatistiksel olarak anlamli şekilde yükseldiği tespit edildi. Bulgularımız literatür ile uygunluk göstermiştir.

4 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyonun gerçekleştirildiği bir çalışmada CAT aktivitesinin K grubuna göre anlamli derecede azaldığı tespit edilmiştir.¹⁹⁰ Yapılan başka bir çalışmada alt ekstremitelerine turnike yardımıyla 3 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uygulanan sıçanların gastrokinemius kaslarında CAT enzim aktivitesinin K grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir.¹⁹¹ CAT enzim aktivitesinde İ/R grubunda K grubuna göre azaldığı görüldü. İ/R oluşturulan ratlarda tedavi öncesi uygulanan naringinli grupta CAT aktivitelerinde İ/R grubuna oranla önemli oranda arttığı görüldü. Ve bu artışın istatistiksel açıdan anlamli ($p<0.05$) olduğu tespit edildi. Son yıllarda naringinin yüksek kolesterollü beslenen tavşanlarda mRNA ekspresyonları upregülasyonu ile SOD ve CAT aktivitelerini arttırarak antioksidan kapasiteyi düzenlemede önemli rol oynadığı bildirilmektedir.¹⁹² Ayrıca İ/R+SİL grubunda, H_2O_2 'i O_2 ve H_2O 'ya parçalayan ve bu şekilde H_2O_2 'ten $OH^\bullet$ oluşumunu önleyebilmek amacıyla H_2O_2 'nin sprlmesini sağlayan CAT^{88} düzeyleri K'ya yaklaşarak yükseldiği ve İ/R grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamli fark gözlendi.

CAT gibi SOD'un etkisi ile oluşan H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ye eviren diğer bir enzim GSH-Px'dir; ancak bu enzim bu işlemi yaparken indirgenmiş GSH kullanır. Bu reaksiyon sonucunda GSH dislfide yükseltgenir ve GSH-R enzimiyle tekrar GSH'ya indirgenir; böylece vücutta GSH depoları korunmaya çalışılır.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Yapılan bir çalışmada alt ekstremitelerine turnike yardımıyla 2 saat iskemi, 3 saat reperfüzyon uygulanan sıçanların İ/R grubu GSH-Px düzeylerinin K grubuna göre önemli ölçüde artış gösterdiği tespit edilmiştir.¹⁹⁶ alışmamızda GSH-Px enzim aktivitesinde İR grubunda K grubuna göre istatistiksel olarak anlamli ($p<0.05$) bir azalma olduğu tespit edilmiştir. H_2O_2 detoksifiye edilmesinde görev alan bu enzimin aktivitesindeki azalma

İ/R süresince yoğun biçimde SOR oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca İ/R grubunda yoğun serbest radikal üretimi olduğunu gösteren GSH-Px enzim düzeyinin anlamlı derecede azalmış olduğu ancak İ/R+NAR, İ/R+SİL ve İ/R+NAR+SİL gruplarında GSH-Px K'ya yaklaşarak arttığı görülmüştür.

İ/R'den dolayı O₂ miktarı azalmasına bağlı olarak aşırı miktarlarda serbest radikaller oluşur. Ortamda yeterli O₂ olmadığı için LDH enzimi NADH'yı kullanarak, piruvat'ı laktat'a dönüştürür. Bu da yeterli O₂ olmayan ortamlarda ATP oluşumunu sağlar. İskemi sonrası dokularda oluşan hipoksik şartlarda hücreler enerji temini için anerobik metabolizmayı kullanırlar. Anaerobik metabolizma sonrası dokularda laktik asit birikimi meydana gelir ve buna bağlı olarak serum LDH enzim düzeyinde bir artış meydana gelir. LDH enzimi, anaerobik metabolizma sonrası oluşan pirüvik asitin laktik aside dönüştüren reaksiyonu katalizler Ozaki ve arkadaşları, hepatic reperfüzyondan sonra, serum LDH enzim aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir.¹⁹⁷ Laktat, iskemi süresince artar ve reperfüzyonun 15. dakikasından itibaren düşme eğilimi gösterir.¹⁹⁸ Kuzon ve arkadaşları, 7 saatlik iskemi ve 4 saatlik reperfüzyon süresince, doku laktat seviyesini iki saat ara ile takibinde, laktat seviyelerinin kararlı seyretmediğini göstermişlerdir.¹⁹⁹ Ayrıca, Köken ve İnal, iskemi grubunda, serum LDH seviyelerini, K grubuna göre yüksek bulmuşlardır.²⁰⁰ Çalışmamızda, her grupta 2 saatlik reperfüzyon sonrasında serumda LDH seviyesi ölçüldü ve K grubuna göre İ/R, İ/R+NAR, İ/R+SİL, İ/R+NAR+SİL gruplarında LDH seviyeleri daha yüksek bulundu. Ancak yalnızca K ile İ/R+NAR+SİL grubu arasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi (p<0.05). Bulgularımız literatür ile uygunluk göstermiştir. LDH hücre hasarının major bir determinantı olmadığı ve yapılan cerrahi girişimin LDH seviyesini çok değiştirebileceği düşünülebilir.

Kas hasarının bir göstergesi olan ve çarpma, ağır egzersiz gibi durumlarda kandaki düzeyi artan CK enzimi düzeyinde ise çalışmamızda İ/R grubunda K grubuna göre büyük artış olduğu tespit edilmiştir. Prem ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 2 saat iskemi ve 30 dakika reperfüzyon süresi sonunda CK düzeyinde K grubuna göre daha büyük bir artış olduğunu tespit etmişlerdir.¹³ Gürsul C. Yaptığı İ/R çalışmasında 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uyguladığı deneysel çalışmasında CK düzeylerinin İR grubunda kontrol grubuna göre büyük artış gösterdiğini bildirmektedir.¹⁸⁸ İskemide yükselen ve doğrudan çizgili kas hasarını gösteren serum CK seviyesi, İ/R grubu ile İ/R+NAR grupları karşılaştırıldığında, İ/R grubunda oldukça yüksek olduğu gözlemlenen CK düzeyinin İ/R+NAR grubunda K'ya yaklaşarak azaldığı görüldü. Serum CK düzeylerinde anlamlı azalmalar görülmesi Naringin ve Silymarinin reperfüzyona maruz kalmış kas dokusunda, antioksidan özellikleri ve SOR'lara karşı süpürücü rolü üstlenerek kas hasarını ve doku yıkımı azaltıcı etkisi olduğunu düşündürür. Serum CK seviyesinin revaskülarizasyon sonrası normale düşmesi 10-12 gün alabilmektedir.²⁰¹

Ayrıca, histopatolojik incelemede, kas dokusunda enflamasyon artışı ve dejenerasyon gözlenmesi; bu biyokimyasal sonuçları desteklemekte idi. İ/R çalışmalarında, reperfüzyon sonrasında antioksidan enzim aktivitesinin düştüğü görülmüş ve bu durum, artan oksidatif stres nedeniyle bu enzimlerin kullanımının artmasına bağlanmıştır.^{172, 202}

Histopatoloji bulgularımızı değerlendirdiğimizde K grubunda çizgili kas liflerinin yapısı normal olarak gözlendi. İ/R grubunda epimisyumda kollajen liflerin ipliksi düzeni bozulmuş ve kollajen lifler arasında çok yoğun bir bağ doku hücresi artışı dikkati çekmekteydi. Kan damarlarından (arteriyol, venül ve kapilerden) epimisyumda yoğun bir lökosit göçü olduğu fark edilmekteydi. İ/R+NAR grubunda epimisyum ve

perimisyumda kollajen liflerin ipliksi düzeni bozulmuş ve kollajen lifler arasında çok yoğun bir bağ doku hücresi artışı dikkati çekmekteydi. İ/R+SİL grubunda genel olarak kas lifleri bütünlüğünü korur ve çizgilenme belirgin iken aradaki bağ dokuda yani perimisyumda hafif bir kollajen ve hücrel artışın olduğu gözlenmekteydi. İ/R+NAR+SİL grubunda ise kas liflerindeki A ve I bandlarının oluşturduğu çizgilenme belirgin olmakla birlikte damarlarda bir dilatasyon ve arterlerin duvar yapısında bir bozulma söz konusu idi.

Bulgularımız serbest radikal oluşturma yeteneği olan İ/R'den kaynaklanan iskelet kası hasarı Naringin ile Silymarin'in bu hasara karşı koruyuculuklarının muhtemelen bu maddelerin antioksidan kapasiteleri ve serbest radikal süpürücü aktiviteleri nedeniyle olduğunu göstermektedir. Naringin ve Silymarin'in uyguladığımız dozlarına bağlı olarak gelişecek akut ve kronik toksisitelerinin bulunmadığı görülmekte ve iskelet kası İ/R hasarını en az düzeye indirmek amacıyla kullanılabilirliği ispatlanmıştır. Ancak klinik uygulamalarda kullanılabilmeleri amacıyla daha fazla sayıda çalışma yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İ/R hasarı mekanizmasının tam olarak anlaşılması, hasarın çabuk ve en uygun bir şekilde önlenmesini sağlayacaktır. Çalışmamızda ölçülen parametreler göz önüne alındığında, İ/R grubunda MDA düzeyinin çok yükseldiği ancak tedavi gruplarında kas hasarının çok azaldığı, SOD, CAT ve GSH-Px enzim düzeylerinin İ/R grubunda oldukça düştüğü ancak tedavi gruplarında K'ya yaklaştığı, CK enzim düzeyinin İ/R grubunda yükseldiği, LDH enzim düzeyi ile ilgili anlamlı sonuçlara ulaşılamadığı ve histopatoloji bulgularımız ışığında yapmış olduğumuz İ/R modelinin başarılı olup İ/R+SİL ile İ/R+NAR+SİL gruplarında etkili sonuçlara ulaştık. Ayrıca alt ekstremitelerde İ/R hasarında Naringin ve Silymarin'in ilk defa kullanılması ile elde edilen bulguların, antioksidan kapasiteye sahip Naringin ve Silymarin'in temel olarak SOR oluşumunun oluşumunu azaltarak veya önleyerek İ/R hasarına karşı koruyucu olabileceklerini göstermektedir. Ancak, Naringin ve Silymarin'in etki mekanizmalarının tam olarak saptanabilmesi yalnızca bu verilerle mümkün görünmemektedir. Bu çalışmada, İ/R hasarı modeli oluşturulan sıçanlarda, araştırmada Naringin ve Silymarin'in etkisi incelenmiştir. Her ne kadar Naringin ve Silymarin'in etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamadıysa da, İ/R hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu yönüyle çalışmamızda etkili bulunan Naringin ve Silymarin'in, klinikte uygulama alanı bulabilmesi için bir dizi klinik ilaç araştırmalarının yapılması gerektiğini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America*, 1992, 72: 65-83.
2. Robert W, Hobson II, Vincent JM, Walter ND. Pathophysiology of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. In: Haimovici H (ed). *Haimovici's Vascular Surgery. Principal and Techniques*, 4th ed. Cambridge, Blackwell Science, 1996: 497-508.
3. Parrino PE, Laubach VE, Gaughen JR, Jr., Shockey KS, Wattsman TA, King RC, Tribble CG, Kron IL. Inhibition of inducible nitric oxide synthase after myocardial ischemia increases coronary flow. *The Annals of Thoracic Surgery*, 1998, 66: 733-739.
4. Cohen LH, Kaplan M, Bernhard VM. Intraoperative streptokinase. An adjunct to mechanical thrombectomy in the management of acute ischemia. *Archives of Surgery*, 1986, 121: 708-715.
5. Hearse DJ. Ischemia, reperfusion, and the determinants of tissue injury. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 1990, 4: 767-776.
6. Shah DM, Bock DE, Darling RCr, Chang BB, Kupinsk iAM, Leather RP. Beneficial effects of hypertonic mannitol in acute ischemia--reperfusion injuries in humans. *Vascular Surgery*, 1996, 4: 97-100.
7. Smeets HJ, Camps J, van Milligen de Wit AW, Kievit J, van Bockel JH, Hermans J, Berger HM. Influence of low dose allopurinol on ischaemia--reperfusion injury during abdominal aortic surgery. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 1995, 9.
8. Dammers R, Wehrens XH, oude Egbrink MG, Slaaf DW, Kurvers HA, Ramsay G. Microcirculatory effects of experimental acute limb ischaemia-reperfusion. *British Journal of Surgery*, 2001, 88: 816-824.

9. Rubin BB, Romaschin A, Walker PM, Gute DC, Korthuis RJ. Mechanisms of postischemic injury in skeletal muscle: intervention strategies. *Journal of applied physiology*, 1996, 80: 369-387.
10. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Archives of Surgery*, 1991, 126: 104-105.
11. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *British Journal of Surgery*, 1991, 78: 651-655.
12. Weinbroum AA, Hochhauser E, Rudick V, Kluger Y, Karchevsky E, Graf E, Vidne BA. Multiple organ dysfunction after remote circulatory arrest: common pathway of radical oxygen species?. *Journal of Trauma*, 1999, 47: 691-698.
13. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *American Journal of Surgery*, 1999, 178: 147-150.
14. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*, 1994, 81: 637-647.
15. Lin E LS, Calvano SE. The systemic response to injury. In: S1 S (ed). *Principles of Surgery*, 7th ed. Cambridge, Blackwell Science, 1999: 13-32.
16. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circulation Research*, 2000, 86: 117-118.
17. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 1998, 39: 1529-1542.
18. Gillani S, Cao J, Suzuki T, Hak DJ. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle. *Injury*, 2012, 43: 670-675.

19. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury-a review. *Journal of Surgical Research*, 2008, 150: 304-330.
20. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*, 2004, 24: 468-475.
21. İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. *Journal of the Neurological Sciences*, 2000, 7: 1984-2000.
22. Kuzu MA, Koksoy C, Kale IT, Tanik A, Terzi C, Elhan AH. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *American Journal of Surgery*, 1998, 176: 348-351.
23. Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR. Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1993, 92: 1162-1172.
24. Bathe OF, Chow AW, Phang PT. Splanchnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery*, 1998, 123: 79-88.
25. Terzi C, Kuzu A, Tanik A, Kale T, Aşlar K, Elhan A. Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde profilaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *Klinik ve Deneysel Cerrahi*, 2000, 8: 10-16.
26. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aşlar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni*, 2001, 2: 154-167.
27. Dennis SC, Shattock MJ, Hearse DJ, Ball MR, Sochor M, McLean P. Two different metabolic responses to ischaemia: inherent variability or artefact? *Cardiovascular Research*, 1983, 17: 489-498.

28. Alizan A, Khalil C, Farah A, John C. Reperfusion injury. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2006, 117: 1024-1033.
29. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery*, 1975, 78: 95-104.
30. Duru S, Koca U, Oztekin S, Olguner C, Kar A, Coker C, Ulukus C, Tascl C, Elar Z. Antithrombin III pretreatment reduces neutrophil recruitment into the lung and skeletal muscle tissues in the rat model of bilateral lower limb ischemia and reperfusion: a pilot study. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 2005, 49: 1142-1148.
31. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1998, 179: 169-187.
32. Hobson RW, 2nd, Neville R, Watanabe B, Canady J, Wright JG, Belkin M. Role of heparin in reducing skeletal muscle infarction in ischemia-reperfusion. *Microcirculation, endothelium, and lymphatics*, 1989, 5: 259-276.
33. Koksall C, Bozkurt AK, Sirin G, Konukoglu D, Ustundag N. Aprotinin ameliorates ischemia/reperfusion injury in a rat hind limb model. *Vascular Pharmacology*, 2004, 41: 125-129.
34. Leena S, Korvenoja M, Markku A. Glucose, lactate and pyruvate response in an experimental model of microvascular flap ischemia and reperfusion: A Microdialysis Study. *Microsurgery*, 2004, 24: 223-231.
35. Tokito A, Silva J. Ischemia and reperfusion syndrome of hind limbs functional and histological renal changes in rats. *Medicine Riberio Preto*, 2005, 38: 294-300.
36. Arasa O, Dilsizian V. Targeting ischemic memory. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18: 46-51.

37. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*, 2001, 94: 1133-1138.
38. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Critical Care Medicine*, 1993, 21: 1376-1386.
39. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovascular Surgery*, 2002, 10: 620-630.
40. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *American Journal of Physiology*, 1986, 250: 749-753.
41. Schlag MG, Harris KA, Potter RF. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2001, 280: 1716-1721.
42. Rupinski S. Effect of tourniquet ischemia of the arm on changes in selected parameters of muscle metabolism. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, 1989, 35: 131-143.
43. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 1988, 254: 823-827.
44. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free radical research communication*, 1989, 7: 255-264.
45. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Oxidase in Ischemic Rat Intestine-a Reevaluation. *American Journal of Physiology*, 1988, 254: 768-774.

46. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual Review of Medicine*, 1991, 42: 225-246.
47. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. Basic Pathology. In: Wi B. (ed). 6th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000: 10, 30-36.
48. Yıldar M. Deneysel Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Splenektomi Ve Gadolinium Chloride (GdCl₃)'in Koruyucu Etkisi. Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 2008.
49. Davies MG, Juynh TTT, Hagen P-O. Ischemia-Reperfusion Injury, *Endothelial physiology*. In: Grace PA, Mathie RT (eds). London, Blackwell Science, 1999: 157-179.
50. Bulkey GB. Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. *British Journal of Cancer*, 1987, 55: 66-73.
51. Rubin BB, Smith A, Liauw S, Isenman D, Romaschin AD, Walker PM. Complement activation and white cell sequestration in postischemic skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 1990, 259: 525-531.
52. Yavuzer N. Karaciğerde İskemi Reperfüzyon ile İndüklenmiş Rejenerasyon Modelinde Kompleman İnhibitörünün Rolü. Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi, 2008.
53. Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2001, 36: 55-65.
54. Russel RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB Journal*, 1995, 9: 526-533.

55. Pellegrini N, Miglio C, Del Rio D, Salvatore S, Serafini M, Brighenti F. Effect of domestic cooking methods on the total antioxidant capacity of vegetables. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2009, 2: 12-22.
56. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*, 2009, 681: 51-67.
57. Hassimotto NMA, Pinto MDS, Lajolo FM. Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56: 11727–11733.
58. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 2006, 113: 189-207.
59. Kusano C, Ferrari B. Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2008, 7: 1-15.
60. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, 1987, 107: 526-545.
61. Özdem SS, Sadan G. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi. *Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1994, 11: 63-71.
62. Cornelli U. Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, 2009, 27: 175-194.
63. Kapoor VK, Dureja J, Chadha R. Herbals in the control of ageing. *Drug Discovery Today*, 2009, 14: 992-998.
64. Aruoma OI, Kaur H, Halliwell B. Oxygen free radicals and human diseases. *Journal of the Royal Society of Health*, 1991, 111: 172-177.

65. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, 1984, 105: 273-282.
66. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proceedings*, 1988, 63: 381-389.
67. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Experimental Nephrology*, 1995, 3: 348-354.
68. Gulcin I, Oktay M, Kirecci E, Kufrevioglu OI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemical*, 2003, 83: 371-382.
69. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *American Journal of Medicine*, 1991, 91: 23-30.
70. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Ankara, 1.Baskı. Medisan Yayın Serisi, 1998: 272-355.
71. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 2000, 153: 83-104.
72. Schiller HJ, Andreoni KA, Bulkley GB. Free radical ablation for the prevention of post-ischemic renal failure following renal transplantation. *Wien Klin Wochenschr*, 1991, 69: 1083-1094.
73. Bitter-Suermann D. Contribution of complement factors and reaction pathways to inflammation. *Agents and actions supplement*, 1982, 11: 159-178.
74. Morgan BP. Complement regulatory molecules: application to therapy and transplantation. *Immunology Today*, 1995, 16: 257-259.
75. Schifferli JA, Peters DK. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *The New England Journal of Medicine*, 1986, 315: 488-495.

76. Sim RB, Tsiftoglou SA. Proteases of the complement system. *Biochemical Society Transactions*, 2004, 32: 21-27.
77. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 2004, 21: 401-409.
78. Link C, Hawlisch H, Meyer zu Vilsendorf A, Gyleruz S, Nagel E, Kohl J. Selection of phage-displayed anti-guinea pig C5 or C5a antibodies and their application in xenotransplantation. *Molecular Immunology*, 1999, 36: 1235-1247.
79. Stahl GL, Xu Y, Hao L, Miller M, Buras JA, Fung M, Zhao H. Role for the alternative complement pathway in ischemia/reperfusion injury. *American Journal of Pathology*, 2003, 162: 449-455.
80. Buerke M, Murohara T, Lefer AM. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 1995, 91: 393-402.
81. Gülçin İ, Oktay M, Köksal E, Şerbetçi H, Beydemir S, Küfrevioğlu Öİ. Antioxidant and radical scavenging activities of uric acid. *Asian Journal Chemistry*, 2008, 20: 2079-2090.
82. Giacco R, Clemente G, Cipriano D, Luongo D, Viscovo D, Patti L, Di Marino L, Giacco A, Naviglio D, Bianchi MA, Ciati R, Brighenti F, Rivellese AA, Riccardi G. Effects of the regular consumption of wholemeal wheat foods on cardiovascular risk factors in healthy people. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2010, 20: 186-194.
83. Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, Gartner C, Haenen G, Hollman P, Holst B, Kelly FJ, Polidori MC, Rice-Evans C, Southon S, van Vliet T, Vina-Ribes J, Williamson G, Astley SB. Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 2002, 23: 39-100.

84. Gulcin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Science*, 2006, 78: 803-811.
85. Gulcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 2012, 86: 345-391.
86. Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 1998, 18: 667-682.
87. Güven A, Erginsoy S, Kaya N. Kazlarda karbon tetraklorür zehirlenmesinin biyokimyasal ve patolojik parametrelere etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2003, 9: 131-136.
88. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 2004, 36: 1-9.
89. Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymology*, 1984, 105: 93-104.
90. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 1981, 81: 22-29.
91. Gul M, Kutay FZ, Temocin S, Hanninen O. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian The Journal of Experimental Biology* 2000, 38: 625-634.
92. Sen CK. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1999, 196: 31-42.
93. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 1983, 52: 711-760.
94. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione

- and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005, 16: 577-586.
95. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 1995, 18: 1-11.
96. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacology and Therapeutics*, 1988, 37: 231-249.
97. Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Acikgoz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology*, 2004, 202: 227-235.
98. Slater TF. Free radicals and tissue injury: fact and fiction. *British Journal of Cancer*, 1987, 8: 5-10.
99. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1993, 57: 715-724.
100. Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1987, 44: 227-253.
101. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 1990, 16: 259-264.
102. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW. Harper's Biochemistry. In: 25. th ed. *Appleton and Lange Publications*, 2000.
103. Laudat A, Foucault P, Palluel AM. Relationship between seminal LDH-C4 and spermatozoa with acrosome anomalies. *Clinica Chimica Acta*, 1997, 265: 219-224.

104. Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, Spaterna A, Porciello F, Antonioni MT, Gaiti A. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 1998, 119: 833-836.
105. Washizu T, Nakamura M, Izawa N, Suzuki E, Tsuruno S, Washizu M, Nakajo S, Arai T. The activity ratio of the cytosolic MDH/LDH and the isoenzyme pattern of LDH in the peripheral leukocytes of dogs, cats and rabbits. *Veterinary Research Communucations*, 2002, 26: 341-346.
106. Turgut K. Veteriner klinik laboratuvar teşhis. Genişletilmiş 2. Baskı,. Bahçivanlar basım sanayi, Konya, 2000: 885-886.
107. Onat T. *Enzimler, İçinde: Aslan D. Klinik kimyada temel ilkeler*. 1 Baskı. Palme yayıncılık, İstanbul, 2005: 352-389.
108. Burtis CA, Ashwood ER. Teitz textbook of cilinical chemistry. 2.th ed. Pennsylvania, WB Saunders, *Cilinical Chemistry*. 1994: 779-812.
109. Chattington P, Clarke D, Neithercut WD. Creatine kinase isoform electrophoresis for early confirmation of myocardial infarction detected by timed sequential CK slope analysis. *Postgraduate Medical Journal*, 1994, 70: 108-114.
110. Ng YC, Tolerico PH, Book CB. Alterations in levels of Na(+)-K(+)-ATPase isoforms in heart, skeletal muscle, and kidney of diabetic rats. *American Journal of Physiology*, 1993, 265: 243-251.
111. Painter PC, Van Meter S, Dabbs RL, Clement GE. Analytical evaluation and comparison of Dupont aca lactate dehydrogenase-1 (LD1) isoenzyme assay diagnostic efficiency for acute myocardial infarction detection with other LD1 methods and aca CK-MB. A two-site study. *Angiology*, 1994, 45: 585-595.
112. Morandi L, Angelini C, Prella A, Pini A, Grassi B, Bernardi G, Politano L, Bruno C, De Grandis D, Cudia P, Citterio A. High plasma creatine kinase: review of the

- literature and proposal for a diagnostic algorithm. *Journal of the Neurological Science*, 2006, 27: 303-311.
113. Gulcin I, Elias R, Gepdiremen A, Chea A, Topal F. Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: cepharanthine and fangchinoline. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2010, 25: 44-53.
 114. Gülçin İ, M. E, Aboul-Enein HY. Antioxidant activity of clove oil-a powerful antioxidant source. *Arabian Journal of Chemistry*, 2011, 4: 361-367.
 115. Gülçin İ, Şat İG, Beydemir Ş, Küfrevioğlu Öİ. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Italian Journal of Food Science*, 2004, 16: 17-30.
 116. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report*, 2004, 9: 145-152.
 117. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diyabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2006, 31: 51-56.
 118. Balasundram N, Sundram K, Saman S. Phenolic compounds in plants agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006, 99: 191-203.
 119. Shahidi F, Naczek M. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications. *Technomic Publishing Co*, 1995: 128-136.
 120. Gulcin I, Topal F, Cakmakci R, Bilsel M, Goren AC, Erdogan U. Pomological features, nutritional quality, polyphenol content analysis, and antioxidant properties of domesticated and 3 wild ecotype forms of raspberries (*Rubus idaeus* L.). *Journal of Food Science*, 2011, 76: 585-593.

121. Gülçin İ, Topal F, Oztürk Sarıkaya SB, Bursal E, Gören AC, Bilsel M. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Record of Natural Products*, 2011, 5: 158-175.
122. Dragsted LO, Strube M, Leth T. Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: could they prevent cancer? *European Journal of Cancer Prevention*, 1997, 6: 522-528.
123. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, 9: 19-21.
124. Kroyer G. The antioxidant activity of citrus fruit peels. *Z Ernährungswiss*, 1986, 25: 63-69.
125. Ameer B, Weintraub RA, Johnson JV, Yost RA, Rouseff RL. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1996, 60: 34-40.
126. Motilva V, Alarcon de la Lastra C, Martin MJ. Ulcer-protecting effects of naringenin on gastric lesions induced by ethanol in rat: role of endogenous prostaglandins. *Journal of Pharm Pharmacology*, 1994, 46: 91-94.
127. Parmar NS. The gastric anti-ulcer activity of naringenin, a specific histidine decarboxylase inhibitor. *International Journal of Tissue Reactions*, 1983, 5: 415-420.
128. Rojas D, Sanchez VR, Somoza B, Ortega T, Villar A. Vasodilatory effect of naringenin in rat aorta. *Phytotherapy Research*, 1996, 10: 123-125.
129. So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, Carroll KK. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and Cancer*, 1996, 26: 167-181.

130. Karakaya S, El SN. Flavonoidler ve sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 1997, 26: 54-60.
131. Tsai YJ, Tsai TH. Mesenteric lymphatic absorption and the pharmacokinetics of naringin and naringenin in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 12435-12442.
132. Gaur V, Aggarwal A, Kumar A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 2009: 147-154.
133. Singh D, Chopra K. The effect of naringin, a bioflavonoid on ischemia-reperfusion induced renal injury in rats. *Pharmacological Research*, 2004, 25: 187-193.
134. Aggarwal A, Gaur V, Kumar A. Nitric oxide mechanism in the protective effect of naringin against post-stroke depression (PSD) in mice. *Life Science*, 2010: 928-935.
135. Yang CP, Liu MH, Zou W, Guan XL, Lai L, Su WW. Toxicokinetics of naringin and its metabolite naringenin after 180-day repeated oral administration in beagle dogs assayed by a rapid resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometric method. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2012, 14: 68-75.
136. Innocenti A, Gülçin İ, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Antioxidant polyphenols effectively inhibit mammalian isoforms I–XV. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20: 5050–5053.
137. Koksall E, Gulcin I, Beyza S, Sarikaya O, Bursal E. In vitro antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2009, 24: 395-405.

138. Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian Journal of Medical Research* 2006, 124: 491-504.
139. Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin-new effects and applications. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 2005, 149: 29-41.
140. Frascini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clinical Drug Investigation*, 2002, 22: 51-65.
141. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*, 2001, 61: 2035-2063.
142. Singh RP, Aggarwal R. Prostate cancer prevention by silibinin. *Current Cancer Drug Targets*, 2004, 4: 1-11.
143. Yang SH, Lin JK, Chen WS, Chiu JH. Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line. *Journal of Surgical Research*, 2003, 113: 133-138.
144. Lirussi F, Beccarello A, Zanette G, De Monte A, Donadon V, Velussi M, Crepaldi G. Silybin-beta-cyclodextrin in the treatment of patients with diabetes mellitus and alcoholic liver disease. Efficacy study of a new preparation of an anti-oxidant agent. *Diabetes Nutrition and Metabolism*, 2002, 15: 222-231.
145. Rao PR, Viswanath RK. Cardioprotective activity of silymarin in ischemia-reperfusion-induced myocardial infarction in albino rats. *Experimental and Clinical Cardiology*, 2007, 12: 179-187.
146. Radko L, Cybulski W. Application of silymarin in human and animal medicine. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*, 2007, 1.
147. Wu JW, Lin LC, Tsai TH. Drug-drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 121: 185-193.

148. Wu JW, Lin LC, Hung SC, Chi CW, Tsai TH. Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 45: 635-641.
149. Křena VB, Walterová D. Silybin and Silymarin—new effects and applications. *Biomedical Papers*, 2005, 149: 29-41.
150. Yoo HG, Jung SN, Hwang YS, Park JS, Kim MH, Jeong M, Ahn SJ, Ahn BW, Shin BA, Park RK, Jung YD. Involvement of NF-kappaB and caspases in silibinin-induced apoptosis of endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 2004, 13: 81-86.
151. Kang JS, Park SK, Yang KH, Kim HM. Silymarin inhibits TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Letters*, 2003, 550: 89-93.
152. Raza SS, Khan MM, Ashafaq M, Ahmad A, Khuwaja G, Khan A, Siddiqui MS, Safhi MM, Islam F. Silymarin protects neurons from oxidative stress associated damages in focal cerebral ischemia: a behavioral, biochemical and immunohistological study in Wistar rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 2011, 309: 45-54.
153. Muley MM, Thakare VN, Patil RR, Kshirsagar AD, Naik SR. Silymarin improves the behavioural, biochemical and histoarchitecture alterations in focal ischemic rats: a comparative evaluation with piracetam and protocatechuic acid. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2012, 102: 286-293.
154. Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine*, 2007, 14: 129-135.
155. Senturk H, Kabay S, Bayramoglu G, Ozden H, Yaylak F, Yucel M, Olgun EG, Kutlu A. Silymarin attenuates the renal ischemia/reperfusion injury-induced

- morphological changes in the rat kidney. *World Journal of Urology*, 2008, 26: 401-407.
156. Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1993, 18: 289-297.
157. Pepping J. Milk thistle: *Silybum marianum*. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 1999, 56: 1195-1197.
158. Schandalik R, Gatti G, Perucca E. Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silipide and silymarin in cholecystectomy patients. *Arzneimittelforschung*, 1992, 42: 964-968.
159. Darendelioglu S. Ketamin, Propofol ve Etomidatın Çizgili Kas İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması. Tıp Fakültesi, Anestezi ve Reanimasyon Ana Bilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş: Sütçü İmam Üniversitesi, 2008.
160. Aebi H. Catalase. *Methods of enzymatic analysis*, 1974, 10: 673-677.
161. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 1988, 34: 497-500.
162. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1967, 70: 158-169.
163. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 1990, 186: 407-421.
164. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193: 265-275.

165. Walden DL, McCutchan HJ, Enquist EG, Schwappach JR, Shanley PF, Reiss OK, Terada LS, Leff JA, Repine JE. Neutrophils accumulate and contribute to skeletal muscle dysfunction after ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology*, 1990, 259: 1809-1812.
166. Tiidus PM, Holden D, Bombardier E, Zajchowski S, Enns D, Belcastro A. Estrogen effect on post-exercise skeletal muscle neutrophil infiltration and calpain activity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2001, 79: 400-406.
167. Klenerman L, Biswas M, Hulands GH, Rhodes AM. Systemic and local effects of the application of a tourniquet. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1980, 62: 385-388.
168. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *Journal of Pineal Research*, 2005, 39: 57-65.
169. Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. Reactive oxygen species and molecular biology of ischemia/reperfusion. *Annals of Transplantation*, 2004, 9: 81-83.
170. Erkanli K, Kayalar N, Erkanli G, Ercan F, Sener G, Kirali K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Journal of Pineal Research*, 2005, 39: 238-242.
171. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascular Pharmacology*, 2007, 47: 108-112.
172. Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yegen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Journal of Pineal Research*, 2002, 32: 120-126.

173. Belkin M, LaMorte WL, Wright JG, Hobson RW, 2nd. The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *Journal of Vascular Surgery*, 1989, 10: 14-19.
174. Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *Journal of Vascular Surgery*, 1994, 19: 623-631.
175. Hobson II RW, Milazzo VJ, Duran WN. Pathophysiology of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. In: Ih H (ed). *Vascular Surgery*, New York, Blackwell Science, 1996: 497-508.
176. Jeffrey T, Michael E, Garry L. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia / reperfusion injury in the rat hind limb model. *Annals of Surgery*, 1999, 178: 147-150.
177. Hardy SC, Homer-Vanniasinkam S, Gough MJ. The triphasic pattern of skeletal muscle blood flow in reperfusion injury: an experimental model with implications for surgery on the acutely ischaemic lower limb. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 1990, 4: 587-590.
178. Hong RW, Rounds JD, Helton WS, Robinson MK, Wilmore DW. Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. *Annals of Surgery*, 1992, 215: 114-119.
179. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *Journal of Pineal Research*, 2003, 34: 1-10.
180. Wehrens XHT, Rouwet EV, Egbrink MGA, Slaaf DW, Ramsay G. Effects of experimental lower limb ischemia-reperfusion injury on the mesenteric circulation. *British Journal of Surgery*, 2002, 89: 185.

181. Rajadurai M, Stanely Mainzen Prince P. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences. *Toxicology*, 2006, 228: 259-268.
182. Jung G, Hennings G, Pfeifer M, Bessler WG. Interaction of metal-complexing compounds with lymphocytes and lymphoid cell lines. *Molecular Pharmacology*, 1983, 23: 698-702.
183. Francis AR, Shetty TK, Bhattacharya RK. Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis*, 1989, 10: 1953-1955.
184. Kanno S, Shouji A, Asou K, Ishikawa M. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2003, 92: 166-170.
185. Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Lee MK, Nam KT, Park YB, Rhee SJ, Choi MS. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Science*, 2001, 69: 2855-66.
186. D. S, Chander V, Chopra K. Protective effect of naringin, a bioflavonoid on glycerol-induced acute renal failure in rat kidney. *Toxicology*, 2004, 201: 143-141.
187. Corbucci GG, Marchi A, Velluti C, Chelo C, Grella E, Lettieri B. Antioxidant property of Propofol in the ischemic and reperfused human skeletal muscle. *Minerva Anesthesiol*, 2002, 68: 13-6.
188. Gürsul C. Sıçanlarda Deneysel Oluşturulan Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında Leflunomidin Koruyucu Etkinliği. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2012.

189. Kanko M, Maral H, Akbas MH, Ozden M, Bulbul S, Omay O, Yavuz S, Berki KT. Protective effects of clopidogrel on oxidant damage in a rat model of acute ischemia. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2005, 205: 133-139.
190. Avci G, Kadioglu H, Sehirli AO, Bozkurt S, Guclu O, Arslan E, Muratli SK. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Journal of Surgical Research*, 2012, 172: 39-46.
191. Atahan E, Ergun Y, Kurutas EB, Alici T. Protective effect of zinc aspartate on long-term ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Biological Trace Element Research*, 2010, 137: 206-215.
192. Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Kim YH, Nam KT, Jeong TS, Park YB, Choi MS. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clinica Chimica Acta*, 2002, 317: 181-190.
193. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins-Pathologic Basis of Disease In: Pennsylvania WBP (ed). 50th ed. *Saunders Company*, 1994: 1-34.
194. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1974, 41: 35-97.
195. Ogawa T, Mimura Y. Antioxidant effect of zinc on acute renal failure induced by ischemia-reperfusion injury in rats. *American Journal of Nephrology*, 1999, 19: 609-614.
196. Ozkan F, Senayli Y, Ozyurt H, Erkorkmaz U, Bostan B. Antioxidant effects of propofol on tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury: an experimental study. *Journal of Surgical Research*, 2012, 176: 601-607.
197. Ozaki M, Nakamura M, Teraoka S, Ota K. Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia-reperfusion injury. *Transplant International*, 1997, 10: 96-102.

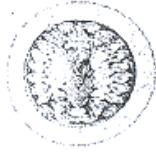
198. Rubin BB, Shinta L, Jacques T, Romaschin AD, Walker PM. Prolonged adenine nucleotide resynthesis and reperfusion injury in postischemic skeletal muscle. *American Journal of Physiology*, 1992, 262: 1531-1547.
199. Kuzon WM, Jr., Walker PM, Mickle DA, Harris KA, Pynn BR, McKee NH. An isolated skeletal muscle model suitable for acute ischemia studies. *Journal of Surgical Research*, 1986, 41: 24-32.
200. Koken T, Inal M. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clinica Chimica Acta*, 1999, 288: 55-62.
201. Braithwaite B, Quinnes - Baldrich W, Earnshaw J. Skeletal muscle reperfusion syndrome. *Hosp Update*, 1995, 50: 27-33.
202. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *European Journal of Pharmacology*, 2003, 469: 145-152.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Fazile Nur EKİNCİ AKDEMİR
Doğum tarihi	: 19.08.1985
Doğum yeri	: Van
Medeni hali	: Evli, 1 çocuk
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi 04100 AĞRI
Tel	: 0530 4333566
Faks	:
E-mail	: fazilenur85@gmail.com fazilenur85@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Kazım Karabekir Lisesi (2002)
Lisans	: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu (2003-2007)
Yüksek lisans	: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı (2008-2010)
Doktora	: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı (2010- 2013)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: (ÜDS 66.250, Ekim 2009)
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
İLGİ ALANLARI, HOBİLER	

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : B.30.2.ATA.0.23.85-106
Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

29.06.2012
ERZURUM

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 20.06.2012 tarih ve B.30.2.ATA.0.01.02/2748 sayılı yazı.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Mustafa GÜL'ün yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütülecek olan "Sıçanlarda Deneyisel Oluşturulan Alt Ekstremité İskemi-Reperfüzyon Hasarında Naringin ve Silymarinin Koruyucu Etkinliği" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 29.06.2012 tarih ve 7 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 69 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcudun oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof. Dr. Mustafa ATASEVER
Başkan



03 Temmuz 2012

Prof.Dr. S.Selçuk ATAMANALP
Dekan

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI	
Kayıt No	2961
Tarih	29.06.2012
Dosya No	

Toplantı Tarihi : 29.06.2012

Toplantı Sayısı : 7

KARAR NO : 69- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Mustafa GÜL'ün yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürütülecek olan "Sıçanlarda Deneyisel Oluşturulan Alt Ekstremité İskemi-Reperfüzyon Hasarında Naringin ve Silymarinin Koruyucu Etkinliği" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 20.06.2012 tarih ve B.30.2.ATA.0.01.02/2748 sayılı yazıları ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Kampus/ERZURUM

Telefon : 0-442-236 08 80

Fax : 0-442-236 08 81

e-mail: hadyek@atauni.edu.tr