



**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
ALT EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARINDA APOSİNİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Selçuk ALBAYRAK

Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi–2019

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

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN ALT
EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA
APOSİNİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Selçuk ALBAYRAK

**Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM**

ERZURUM

2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN ALT
EKSTREMİTE İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA
APOSİNİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Selçuk ALBAYRAK

Tez Savunma Tarihi : 29.07.2019

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Taha Abdulkadir ÇOBAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR

Onay

Bu çalışmayukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Duygu ARIKAN

Enstitü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi
ERZURUM - 2019

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ	IX
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.İskemi.....	3
2.1.1.İskeminin Tarihçesi	3
2.1.2.İskemi Reperfüzyon Hasarı	4
2.1.3.İskelet Kasında İskemi/Reperfüzyon Hasarı.....	5
2.1.4.İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizması	5
2.2.Aposinin'in Tanımı ve Tarihçesi	7
2.2.1.Aposinin'in Kimyasal Özellikleri.....	8
2.2.2.Aposinin'in Etki Mekanizması	9
2.3.Gastrocnemius Kası	11
2.4.Serbest Radikaller	12
2.4.1.Serbest Radikal Çeşitleri.....	13
2.4.2.Serbest Radikallerin Kaynakları	16
2.4.3.Serbest Radikallerin Hücrel Elemanlar Üzerine Etkileri.....	17
2.5.Antioksidan Savunma Mekanizması	19
2.5.1.Endojen Antioksidanlar	21
2.5.2.Ekzojen Antioksidanlar.....	24

2.6.Oksidatif Stres Parametreleri	26
3.MATERYAL VE METOT.....	28
3.1.Materyal	28
3.1.1.Analizlerde Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	28
3.1.3.Hayvan Materyali	28
3.2.Metod	29
3.2.1.Deneysel Uygulamalar ve Numunelerin Alınması	29
3.2.2.Biyokimyasal Analizler	31
3.2.4.Histopatolojik Analizler.....	39
3.2.5.İstatistiksel Analizler	39
4.BULGULAR.....	40
4.1.Biyokimyasal Bulgular	40
4.1.1.Kan Plazmasına Ait Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları	40
4.1.2. <i>Gastrocnemius</i> Dokusuna Ait Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları	43
4.2.Histopatolojik Bulgular.....	45
5.TARTIŞMA	52
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	61
EKLER	82
EK-1.ÖZGEÇMİŞ	82
EK-2.ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	83
EK-3.ETİK KURUL ONAY FORMU	84

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, bilgi, öneri ve katkılarından yararlandığım, değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM hocama sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalında bulunan değerli hocalarıma, histopatolojik muayenelerdeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Serkan YILDIRIM hocama destekleri için çok teşekkür ederim. Ayrıca hayatım boyunca destekleriyle her an yanımda bulunan aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...

Selçuk ALBAYRAK

ÖZET

Ratlarda Deneyisel Olarak Oluşturulan Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında Aposinin'in Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmada, ratlarda deneyisel olarak oluşturulan alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarında Aposinin'in koruyucu ve tedavi edici etkisinin olup olmadığı araştırıldı.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada, 250-300 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi 32 adet erkek rat her grupta 8 rat olacak şekilde Kontrol, İskemi Reperfüzyon (İ/R), Aposinin (AP) ve AP+İ/R Grubu olmak üzere 4 gruba ayrılarak kafeslere yerleştirildi. Tüm ratlar Ketamin (60mg/kg) ve Ksilazin (8mg/kg) anestezisi altına alınıp, kontrol ve AP grupları hariç diğer 2 gruba anestezi altında sol alt ekstremitteye turnike uygulanıp 2 saat iskemi oluşturuldu (ısının düşük olması ve pençelerin siyanotik olması iskeminin olduğu anlamına geldi), ardından turnikeler açılıp 2 saatlik reperfüzyon oluşturuldu (pençelerin pembeleşmesi ve ısı artışı reperfüzyonun sağlandığını gösterdi). Reperfüzyon sonunda ratlar sakrifiye edilerek kan ve *Gastrocnemius* dokusu örnekleri alındı. Plazmada MDA, SOD, CAT, GSH, GPx, İMA ve AOPP düzeylerine, *Gastrocnemius* kasında MDA, SOD, CAT, GSH ve GPx aktivitesine bakıldı.

Bulgular: Plazma ve *Gastrocnemius* dokusu SOD, CAT, GSH düzeyi ve GPx aktivitesi İ/R grubunda diğer gruplara göre önemli oranda azalırken plazma ve *Gastrocnemius* dokusu MDA ve plazma İMA ve AOPP düzeyleri İ/R grubunda diğer gruplara göre önemli oranda artış gösterdi ($P<0.001$). İ/R grubuna göre AP+İ/R grubunda plazma ve *Gastrocnemius* dokusu SOD, CAT, GSH düzeyi ve GPx aktivitesi önemli oranda artarken plazma ve *Gastrocnemius* dokusu MDA ve plazma İMA ve AOPP düzeyleri önemli oranda azaldı ($P<0.001$).

Sonuç: Biyokimyasal ve histopatolojik bulgular doğrultusunda AP'nin alt ekstremitte İ/R oluşturulan ratlarda lipid peroksidasyonunu azalttığı, antioksidan enzim düzeylerini önemli oranda arttırdığı, oluşan oksidatif stresi önlediği, oluşan kas dokusu striasyon kaybını, hemorajiyi, konjesyonu, zenker nekrozunu, hiyalin dejenerasyonunu ve mononükleer hücre infiltrasyonunu azalttığı görülmektedir. AP'nin alt ekstremitte İ/R oluşturulan ratlarda oluşan hasarı azaltarak tedavi edici ve koruyucu etkisinin olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Aposinin, İskemi-Reperfüzyon, Oksidatif stres, Rat

ABSTRACT

The Investigation of Apocynin' Protective Effect of Experimental Lower Extremity Ischemia Reperfusion in Rats

Aim: In this study, it was investigated whether Apocynin' has protective and therapeutic effect on experimental lower extremity ischemia-reperfusion in rats.

Material and Method: In this study, a total of 32, 250-300 gram Sprague-Dawley male rats were randomly divided into four equal groups containing of 8 rats per group as Control; Ischemia/Reperfusion (I/R); Apocynin (AP) and AP+I/R and placed in cages. All rats were anesthetized with xylazine (8 mg/kg) and ketamine (60 mg/kg). Except for the control and AP group, the left lower limbs of the other 2 groups were applied to 2 hours of ischemia (low temperature and cyanotic claw marks the occurrence of ischemia) and 2 hours of reperfusion (the pinking of the claws and the increase in temperature indicate reperfusion) with tourniquet. Prior 30 minutes to ischemia, rats were given 0.5 mL 10% DMSO i.p. (one times) for control and I/R groups. Prior 30 minutes to ischemia, rats were given AP 20 mg/kg/i.p. (one times) (It was dissolved in 10% DMSO) by intraperitoneal for AP and AP+I/R groups. All of rats were sacrificed after reperfusion, taken blood and dissected *Gastrocnemius* tissues. MDA, SOD, CAT, GSH, GPx, IMA and AOPP levels were measured in the plasma; the levels of MDA, SOD, CAT, GSH and GPx were determined in *Gastrocnemius* muscle.

Results: Plasma and *Gastrocnemius* tissue SOD, CAT, GSH levels and GPx were significantly lower in the I/R group than the other groups but plasma and tissue MDA, plasma IMA and AOPP levels were significantly higher in the I/R group than in the other groups ($P<0.001$). The levels of plasma and *Gastrocnemius* tissue SOD, CAT, GSH levels and GPx were significantly increased in the AP+I/R group according to I/R group ($P<0.001$). The levels of plasma and tissue MDA levels, plasma IMA and AOPP levels were significantly decreased in the AP+I/R group according to I/R group ($P<0.001$).

Conclusion: According to the biochemical and histopathological findings, it is seen that AP reducing of the lipid peroxidation, increased antioxidant enzyme levels, prevented oxidative stress; loss of striation in muscle fibers, hemorrhage, congestion, Zenker's necrosis, hyaline degeneration and mononuclear infiltration experimental lower extremity I/R in rats. It has been determined that apocynin has protective and treatment effect and decrease the injury occurred in experimental lower extremity I/R injury in rats

Keywords: Antioxidant, Apocynin, Ischemia-Reperfusion, Oxidative stress, Rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AOPP	:	İleri oksidasyon protein ürünleri
AP	:	Aposinin
AP-İ/R	:	Aposinin-iskemi/reperfüzyon
ATP	:	Adenozin trifosfat
CAT	:	Katalaz
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
GPx	:	Glutasyon peroksidaz
GR	:	Glutasyon redüktaz
GSH	:	Glutasyon
GST	:	Glutasyon S-transferaz
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
İMA	:	İskemi modifiye albumin
İ/R	:	İskemi/reperfüzyon
K	:	Kontrol
MDA	:	Malondialdehit
NADP	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
¹O₂	:	Singlet oksijen
O^{2•-}	:	Süperoksit
OH-	:	Hidroksil radikali
PMN	:	Polimorfonükleer nötrofil
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SOR	:	Serbest oksijen radikalleri
TBA	:	Tiyobarbitürik asit
TCA	:	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.İskemi/reperfüzyon mekanizması.....	6
Şekil 2.2.Aposinin	7
Şekil 2.3. <i>Apocynin cannabium</i> bitkisi ve <i>Picrorhiza curra</i> bitkisi.....	8
Şekil 2.4.Aposinin aktif dimerizasyonunun oluşumu.....	9
Şekil 2.5.Aposinin tarafından NADPH oksidaz inhibisyon mekanizması	10
Şekil 2.6. <i>Ratta Gastocnemius</i> kasının lateralden görüntüsü.....	12
Şekil 2.7.Glutatyonun yapısı	23
Şekil 3.1.Turnike ile sol alt ekstremitede iskemi oluşturulması.....	30
Şekil 4.1.Plazma MDA düzeyinin gruplara göre dağılımı	41
Şekil 4.2.Plazma SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı.....	41
Şekil 4.3.Plazma CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı.....	41
Şekil 4.4.Plazma GSH düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	42
Şekil 4.5.Plazma GPx aktivitesinin gruplara göre dağılımı.....	42
Şekil 4.6.Plazma AOPP düzeyinin gruplara göre dağılımı	42
Şekil 4.7.Plazma İMA düzeyinin gruplara göre dağılımı	43
Şekil 4.8. <i>Gastrocnemius</i> dokusundaki MDA düzeyinin gruplara göre dağılımı	44
Şekil 4.9. <i>Gastrocnemius</i> dokusundaki SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı.....	44
Şekil 4.10. <i>Gastrocnemius</i> dokusundaki CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı.....	44
Şekil 4.11. <i>Gastrocnemius</i> dokusundaki GSH düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	45
Şekil 4.12. <i>Gastrocnemius</i> dokusundaki GPx aktivitesinin gruplara göre dağılımı.....	45
Şekil 4.13.Kontrol grubu gluteal kas dokusunun normal görünümü.....	46
Şekil 4.14.İ/R grubu gluteal kas dokusunda konjesyon, ödem ve hemoraji.....	46
Şekil 4.15.Aposinin grubu gluteal kas dokusunun normal görünümü.	47

Şekil 4.16. AP+İ/R grubu gluteal kas dokusunda hafif ödem.	47
Şekil 4.17. Kontrol grubu rat <i>Gastrocnemius</i> normal histopatolojik görüntüsü H&E, Bar: 50µm.....	48
Şekil 4.18. İ/R grubu rat <i>Gastrocnemius</i> histopatolojik görüntüsü H&E, Bar: 50µm	49
Şekil 4.19. AP grubu rat <i>Gastrocnemius</i> histopatolojik görüntüsü H&E, Bar: 50µm...	50



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Serbest radikal türleri.....	13
Tablo 2.2. Haber-Weiss ve Fenton Reaksiyonu.....	15
Tablo 2.3. Hücrede bulunan serbest radikallerin kaynakları.....	17
Tablo 2.4. Antioksidanların sınıflandırılması	20
Tablo 2.5. Oksidatif stres parametreleri.....	27
Tablo 3.1. Dokuda MDA tayini	37
Tablo 4.1. Tüm grupların plazmasında ölçülen bazı biyokimyasal parametreler	40
Tablo 4.2. Kontrol ve diğer grupların <i>Gastrocnemius</i> dokusundaki bazı biyokimyasal parametreler	43
Tablo 4.3. <i>Gastrocnemius</i> dokusuna ait histopatolojik bulguların skorlanması	51

1. GİRİŞ

İskemi, bir dokunun veya organın arteriyel veya venöz kan akımında çeşitli nedenlerle meydana gelen azalma veya kesilme sonucunda doku ve organlara yeterli düzeyde perfüzyon sağlanamaması sonucu dokuların oksijensiz ve besinsiz kalmasına iskemi denir. İskemi sonucunda doku veya organların oksijensiz kalmasıyla hipoksi oluşur. Tarif edilen bu iki durumda da iskemi reperfüzyon hasarı oluşarak dokudaki metabolizma anaerobik yöne doğru kayar ve oluşan bu hasar sürecine iskemi/reperfüzyon (İ/R) denir.¹⁻³

Reperfüzyon ise iskemi sırasında doku veya organda meydana gelen enerji ihtiyacının karşılanması ve metabolitlerin uzaklaştırılması için kan akımının yeniden sağlanması olarak tanımlanır. İskemiye uğrayan doku veya organlarda enerji ihtiyacı aerobik olarak sağlanamadığından anaerobik olarak sağlanır. Ancak anaerobik olarak sağlanmasının sonucu olarak bu metabolizma sonrasında metabolitler oluşur. Oluşan metabolitler dokuda perfüzyona uğramadığı için doku da birikerek ve kan akımı ile tüm vücuda yayılır ve uzak dokularda da hasarlara neden olur. Bundan dolayıda reperfüzyon da meydana gelen hasar iskemiye bağlı oluşan hasardan daha fazladır.³⁻⁵

İskelet kasında meydana gelen iskemi, abdominal aortaya geçici süre ile kros-klomp uygulanması sonrasında, tek veya çift taraflı akut femoral arter tıkanıklıklarında, travmatik veya iatrojenik arteriyel yaralanmalarda, damar tıkanıklığı ve tromboembolik durumlarda oluşmaktadır.^{6,7} Ayrıca miyokard infarktüsü, organ transplantasyonu, serebrovasküler olaylar, arter embolilerinde yapılan trombolitik tedaviler, sepsis, şok ve yanık durumları iskemi reperfüzyon nedenleri arasında sayılabilir.⁸

Reperfüzyona maruz kalan iskelet kasında, ilk olarak lokal komplikasyonlar olan ödem ve kas nekrozu meydana gelirken, sonrasında sistemik inflamatuvar yanıt ve devamında ise uzak organ hasarları (böbrek, karaciğer, akciğer vb.) oluşmaktadır.^{9,10}

Aposinin (4'-hidroksi-3'-metoksi-asetofenon) asetovanillon olarak da bilinen düşük toksisite ve özgülüğe sahip nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz enzimi inhibitörü olarak görev yapan hücre içi aktif bir doğal antioksidan ve antienflamatuvar bir asetofenondur. Kardiyovasküler hastalıklarda, astımda, artritte, ve nörolojik hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılmaktadır.¹¹⁻¹⁷

Aposinin ROS'un ana kaynağı olan NADPH oksidazın inhibitörü olduğu için oksidatif stresi baskılayarak ROS üretimini azaltarak hücre ölümlerini azalttığı bilinmektedir.¹⁸ Aposinin'in yapılan çalışmalar sonucunda İ/R hasarına karşı dokuları koruduğu görülmüştür.¹³ Ancak Aposinin'in alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında kullanımıyla alakalı çok az literatüre rastlanmıştır.

Bu amaçla, ratlarda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremitteye iskemi/reperfüzyon hasarında Aposinin'in koruyucu, tedavi edici etkisinin olup olmadığı ve iskemi/reperfüzyon hasarında kullanılabilirliği araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.İskemi

İskemi, dokunun ve organın arteriyel ya da venöz kan akımında meydana gelen azalmaya bağlı olarak yetersiz perfüzyonu sonucu bu dokunun veya organın hipoksiye uğramasıdır. Bunun sonucunda ise doku ve organ ihtiyacı olan besinleri alamadığı için hücrel enerji depoları boşalır ve oluşan toksik metabolitler uzaklaştırılamadığı için hücre ölümü, doku hasarı veya nekroz ile sonuçlanır.^{2,19}

İskemi sonrasında kan akımının yeniden sağlanmasına reperfüzyon adı verilmektedir. İskeminin neden olduğu doku ve organda hasar gelişir. Bu iki durumun birlikte gerçekleşmesine iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı denir. Organ transplantasyonu, hemorajik şok, major cerrahi girişimleri, trombolitik tedavi, resüsitasyon, miyokard infarktüsü ve serebrovasküler hastalıklar gibi birçok klinik durumlar iskemi/reperfüzyon hasarının oluşumunu artırır.^{20,21}

2.1.1.İskeminin Tarihçesi

İskemiye bağlı iskemik hasar Volkmann tarafından 1881 yılında tanımlanarak periferik arter hastalıklarının gelişimine neden olan faktörler ile ilgili ilk adım atılmıştır.²² Cannon 1920’li yıllarda şok ile ilgili toksik faktörleri araştırmıştır ve 1923 yılında ise iskemik dokunun tekrar kanlandırılmasına bağlı sistemik etkilerin ortaya çıktığı fikrini ‘Traumatic Shock’ adlı çalışması ile savunmuştur.²³ Köpeklerde uygulanan ekstremit turnikelerinde deneysel olarak ödemin oluştuğunu 1926 yılında Jepson bildirmiştir.²⁴ Haimovici tarafından ise ilk kez 1960 yılında iskemik ekstremit revaskülarizasyonu ile meydana gelebilecek riski “myonefropatik-metabolik sendrom” olarak tanımlamıştır.²⁵

2.1.2.İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi/reperfüzyon hasarı, organ transplantasyonu, hemorajik şok, major cerrahi girişimleri, trombolitik tedavi, resüsitasyon, miyokard infarktüsü ve serebrovasküler hastalıklar gibi birçok durumun ortak bir klinik tablosudur.^{20, 21} Alt ekstremitelerde oluşan I/R hasarı, özellikle aort cerrahisi sırasında abdominal aortaya geçici bir süre klempe uygulanmasında, travmatik veya iatrojenik arteriyel yaralanmalarda, akut femoral arter tıkanıklıklarında meydana gelmektedir.²⁶

Alt ekstremitelerde I/R hasarında lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde oluşur. Sistemik etkileri ise başta akciğer olmak üzere, kalp, beyin, böbrekler ve tüm organlarda gözlemlenebilir.⁹

Doku ve organlarda görülen iskemik hasarın şiddeti, iskeminin süresi dışında doku ve organların biyokimyasal ve yapısal olarak spesifik farklılıklara sahip olmaları ve iskemi sürelerine bağlıdır. Buna göre iskelet kası, iskemik hasara en hassas dokudur bundan dolayı da alt ekstremitelerde I/R hasarında önemli rol oynar. Alt ekstremitelerde I/R hasarında prognoz kas dokudaki hasar miktarına bağlıdır ve reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır.^{1,9,27}

Reperfüzyon hasarı ise, iskemi periyodunu izleyen zamanda yeniden kanlanma ile doku ya da organlarda meydana gelen hasardır.²⁸ Reperfüzyon ile sistemik dolaşıma çıkan inflamatuvar maddeler, endotel hücre uyarılmasına ve mikrovasküler fonksiyon bozukluğuna yol açar. Buna bağlı olarak yaygın uzak organ hasarları, yüksek mortalite ile seyreden çoklu organ yetmezlik sendromu veya sistemik inflamatuvar yanıt sendromu mikroembolilerle diğer organ kapillerini tıkayarak gelişebilir.^{7,29}

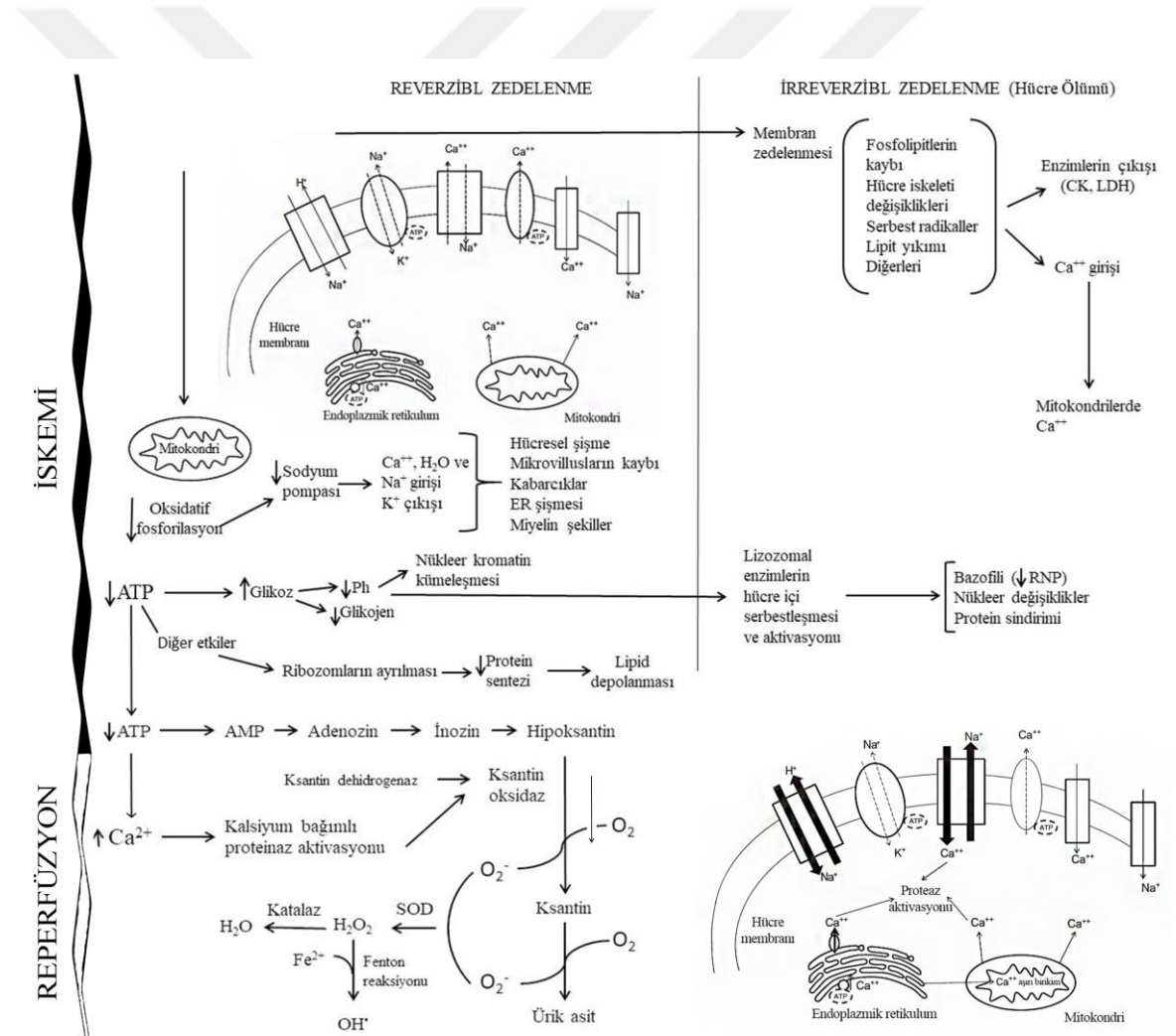
2.1.3.İskelet Kasında İskemi/Reperfüzyon Hasarı

İskelet kası, iskemik hasara en hassas doku olup ekstremitenin esas kütlesini oluşturur. Bundan dolayı da ekstremitedeki İ/R hasarının en önemli kısmını iskelet kası hasarı oluşturur.^{1,9} İskemiye takiben yaklaşık üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık % 97 fonksiyonel doku kaybı olduğu (geri dönüşümsüz zedelenme) spektrofotometrik (triphenyltetrazolium chloride) yöntemlerle gösterilmiştir.³⁰ Kas lifleri, sahip oldukları myoglobin içeriğine göre, kırmızı (Tip 1) ve beyaz (Tip 2) olarak sınıflandırılır. Kasların çoğu her iki türü içerse de bacağın ön kompartmanında Tip 1 ya da yavaş kasılan lifler daha çok baskın olup, enerji üretiminde aerobik metabolizmayı kullanmaları bu kas grubunu iskemiye daha hassas kılar. Bacığın arka kompartmanında; gastrocnemius kasında Tip 2 veya hızlı kasılan lifler baskın olup, enerji üretiminde anaerobik metabolizma ön plandadır. İskeminin süresi ve etkilenen kas lifi tipi iskemik hasarda önemli olmakla birlikte dokunun vücuttaki konumu da önemlidir. Örnek olarak, çabuk soğuma sebebiyle, distal ekstremitte kas dokusu proksimal kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir.^{1,9}

2.1.4.İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizması

İskemi sırasında hücre pH'ında düşüşe neden olan anaerobik metabolizma bulunmaktadır.³¹ Bu pH düşüşüne bağlı hidrojen iyonu birikimini tamponlamak için, Na^+ / H^+ pompası, büyük miktarda sodyum iyonu akışı üreterek fazla miktarda hidrojen iyonu salgılar. Ayrıca iskemi ATPazları etkisiz hale getiren hücre ATP'yi de (Na^+ / K^+ ATPaz) tüketir, aktif Ca^{+2} akışını azaltır ve endoplazmik retikulum (ER) ile kalsiyumun yeniden alımını sınırlar, böylece hücrede kalsiyumun aşırı birikmesine neden olur. Bu değişikliklere, mitokondriyal membran potansiyelinin yayılmasını sağlayan ve ATP üretiminin daha da bozan mitokondriyal membran geçişini sağlayan (MPT) gözeneklerin açılması eşlik eder. Kalpte, bu hücresel değişikliklere hücre içi

proteazların (örneğin kalpainler) aktivasyonu eşlik eder. Ayrıca bu hücrel değişiklikler, myofibrillere zarar vererek hiper kontraktür ve kontraktür bant nekrozu üretir. Bu değişiklikler ve buna bağlı doku zedelenmelerinin derecesi, kan dolaşımındaki düşüşün büyüklüğüne ve iskemik dönemin süresine göre değişmektedir.³² Aşağıda anlatıldığı gibi diğer biyokimyasal olaylar, iskemik yaralanmalara katkıda bulunmayan iskemilerde ortaya çıkar, ancak kan akımının sağlandığı zaman kandaki oksijen ve şekilli elemanlar tarafından beslendiğinde, doku hasarını şiddetlendiren olaylar dizisini tetikler(Şekil 2.1).



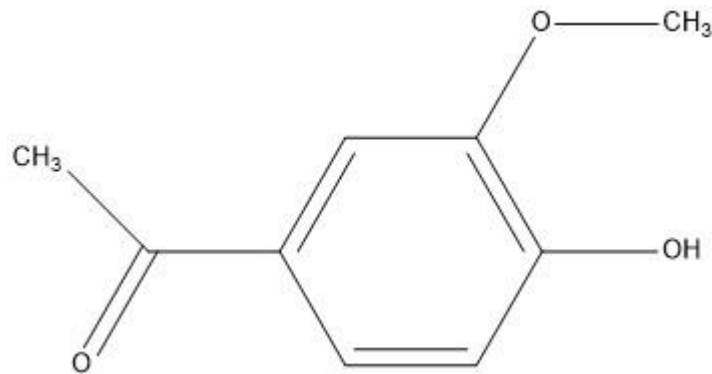
Şekil 2. 1. İskemi/reperfüzyon mekanizması

Her ne kadar hızlı reperfüzyon aerobik ATP üretimi için gerekli olan oksijen ve substratları geri kazandırsa da birikmiş H^+ 'ı yıkayarak hücre dışı pH'ı normalleştirmesine rağmen reperfüzyonun kendisinin zararlı sonuçları olduğu görülmektedir. Reperfüzyon hasarının altında yatan mekanizmalar aşağıda görüldüğü gibi çok faktörlüdür:

1. Kan akışı tekrar sağlandığında moleküler oksijenin yeniden üretilmesiyle birlikte reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşması,
2. Kalsiyum aşırı yüklenmesi,
3. MPT gözeneginin açılması,
4. Endotel disfonksiyonu,
5. Protromojenik bir fenotipin ortaya çıkması,
6. Belirgin inflamatuvar cevaplar şeklinde sıralanabilir³³

2.2.Aposinin'in Tanımı ve Tarihçesi

Aposinin (Şekil 2.2), moleküler oksijenin süperoksit anyonuna tek elektron redüklemesiyle katalize edebilen, bir çok enzimatik kompleks yapısında olan NADPH oksidazın (NOX) en çok kullanılan inhibitörüdür.³⁴



Şekil 2. 2. Aposinin

Asetovanillone (AP, 4-hidroksi-3metoksi-asetofenon) olarak da bilinen Aposinin 1883 yılında ilk kez farmakolog Oswald Schmiedeberg tarafından tanımlanmış ve *Apocynum cannabinum* (Kanada keneviri) (Resim) köklerinden izole edilmiş.^{35,36} 1971

yılında ise Hindistan, Nepal, Tibet ve Pakistan dağlarında yetişen, küçük yıllık bitki olan *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae) (Resim 2) köklerinden de AP elde edilmiştir. *Picrorhiza kurroa*, asetofenon türevleri (anti-astmatik özelliklere sahip), kutkin (hepatoprotektif olan kutkoside ve iridoidler) ve curcubitacins (anti-tümör etkileri olan) olmak üzere bir dizi aktif maddeyi içeren bir tıbbi bitkidir.³⁷ Ayrıca, 1891 yılında Otto tarafından tanımlanmış olan asetovanillona ile Aposinin benzer olduğu doğrulanmıştır.³⁸

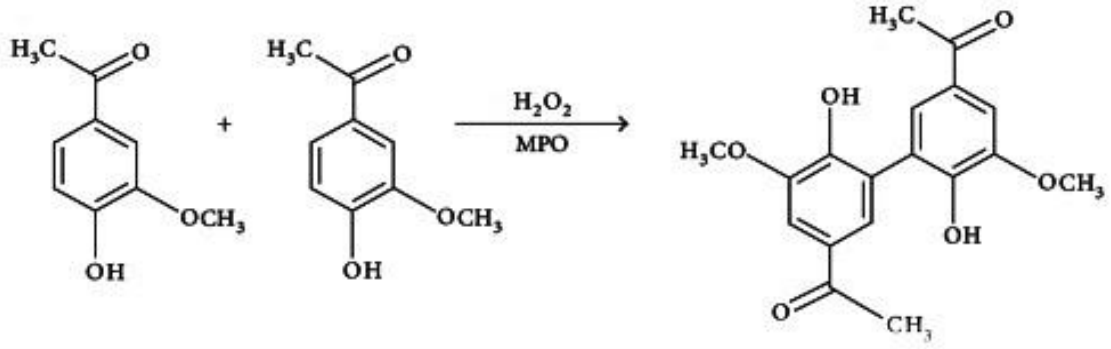


Şekil 2. 3. *Apocynin cannabium* bitkisi ve *Picrorhiza currora* bitkisi

Elde edilen ekstrat ile Çin ve Güney Asyalılar tarafından enflamatuvar hastalıkları ve ödem çözücü olarak kalp hastalıklarının tedavisinde ilaç olarak kullanılmıştır.³⁹ İmmünomodülatör etkisi ise 1990 yılında bulunmuştur.^{39,40}

2.2.1.Aposinin'in Kimyasal Özellikleri

Aposinin, hafif bir vanilya kokusuna sahip, molekül ağırlığı 166.17 olan beyaz kristalimsi yapıda bir asetofenondur ve erime noktası 115°C'dir.³⁶ Çözünürlüğü soğuk suda hafif olmasına karşı sıcak su, alkol, benzen, kloform ve eterde serbest olarak çözünmektedir.⁴¹ Aposinin'in en etkili formu peroksidaz aracılı oksidasyonla bir dimere dönüştürülmüş şeklidir (Şekil 2.4).⁴²



Şekil 2. 4. Aposinin aktif dimerizasyonunun oluşumu⁴⁰

2.2.2.Aposinin'in Etki Mekanizması

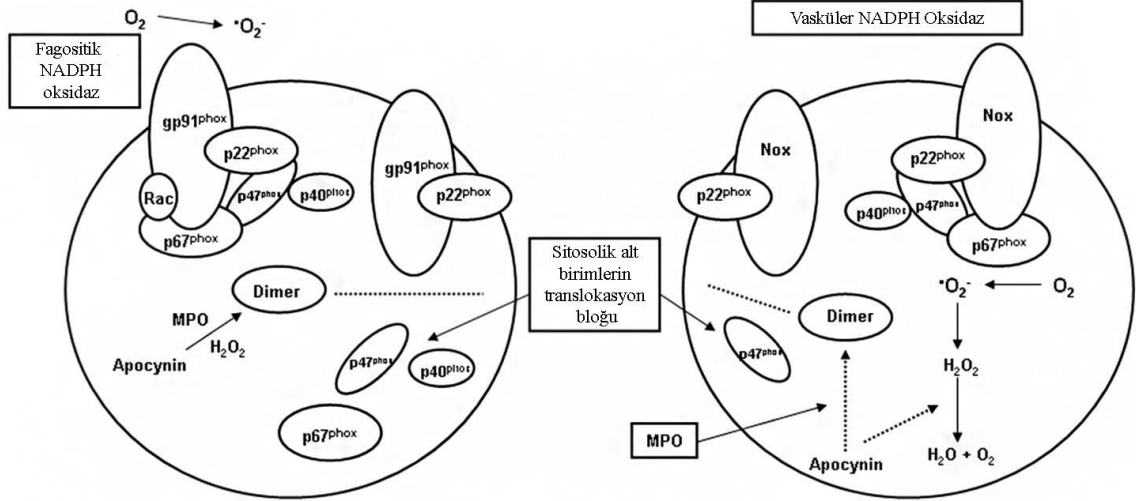
Aposinin, inhibisyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir fakat birçok deneysel çalışmada fagositik ve non-fagositik hücrelerde kompleks NADPH-oksidadın etkili bir inhibitörü olarak kullanılmıştır.^{36,43} Aposinin'in en etkili formu peroksidaz aracılı oksidasyonla bir dimere dönüştürülmüş şeklidir (Şekil 2.5).⁴²

Aposinin, hücre zarında bulunan yapısı oldukça karmaşık NADPH-oksidad kompleksinin iki sitosolik bileşeni olan; iki zar-sınırlı elementlerden (gp91phox ve p22phox), üç sitozolik komponentten (p67phox, p47phox ve p40phox) ve düşük moleküler ağırlıklı bir G proteininden (ya rac 2 ya da rac 1) oluşan bu kompleksin hücre içi translokasyonunun bir inhibitörüdür.^{11,44}

Picrorhiza scrophulariiflora ekstraktında bol miktarda bulunan Aposinin'in sitozolde bulunan bileşenlerin hücre zarına göçünün NADPH-oksidadın aktivasyonunu sağladığı belirtilmiştir.⁴⁵ NADPH-oksidad aktivitesinin ve eş zamanlı ROS üretiminin seçici bir inhibitörü olan Aposinin aktif insan nötrofillerinde ki IC₅₀ değeri 10 µM'dır.⁴⁶

Aposinin p47phox'un lökositler, monositler ve endotelial hücrelerde Nox2'ye translokasyonunu önlemesine rağmen fagositoz veya hücre içi öldürmeyi etkilemediğinden dolayı polimorfonükleer nötrofil (PMN)'lerin diğer savunma mekanizmalarına müdahale etmemektedir.^{40,42} Önemli bir Aposinin raporunda, bir NADPH-oksidad inhibitörü olan Aposinin bileşiğinin miyeloperoksidaz (MPO) ile

aktivasyon gerektirdiği belirtilmiştir.⁴⁶ Aposinin'in etkinliğini arttıran MPO'dur ve MPO'nun salımını zimosan gibi ajanlar destekler.⁴⁷ Buna bağlı olarak MPO'dan yoksun veya eksik olan hücrelerde oksidazı inhibe etmez.⁴⁸



Şekil 2. 5. Aposinin tarafından NADPH oksidaz inhibisyon mekanizması⁴⁹

İnhibisyon sadece Aposinin dimerlerinin varlığında etkilidir, bu durum, bu enzim olmadan vasküler hücrelere MPO eklendiğinde mümkün olan bir durumdur.⁴⁹

Aslında, NADPH-oksidadz aktivitesini bloke eden aktif inhibitör bileşik olduğu ileri sürülen Aposinin'in in vitro ortamdaki anti-inflamatuar etkileri şunlardır;⁴⁷

1. Nötrofillerde oluşabilecek oksidatif hasarının azaltılması,³⁶
2. Nötrofil aracılı oksidatif hasarların önlenmesi,⁴⁶
3. U937 monositik hücre dizisinin tümör nekroz faktörü (TNF) ile tedavi edilen İnsan umbilikal ven endotelial hücrelerinin adezyonunun azalması,¹¹
4. Polimorfonükleer granülosit kemotaksisinin azaltılması,⁵⁰
5. Peroksinitritin inhibisyonu,⁵¹
6. İnflamasyon aracılı kıkırdak yıkımının inhibisyonu.⁴³

Aposinin'in kinetiği hakkında in vivo şartlarda sıçanlara 120 mg/kg Aposinin'in i.p. uygulamasının ardından 20 saatlik bir süre sonra, hayvanların idrarında değişmeden %80 oranında Aposinin atılımı görülmektedir ve Aposinin yan etkileri bilinmemektedir.

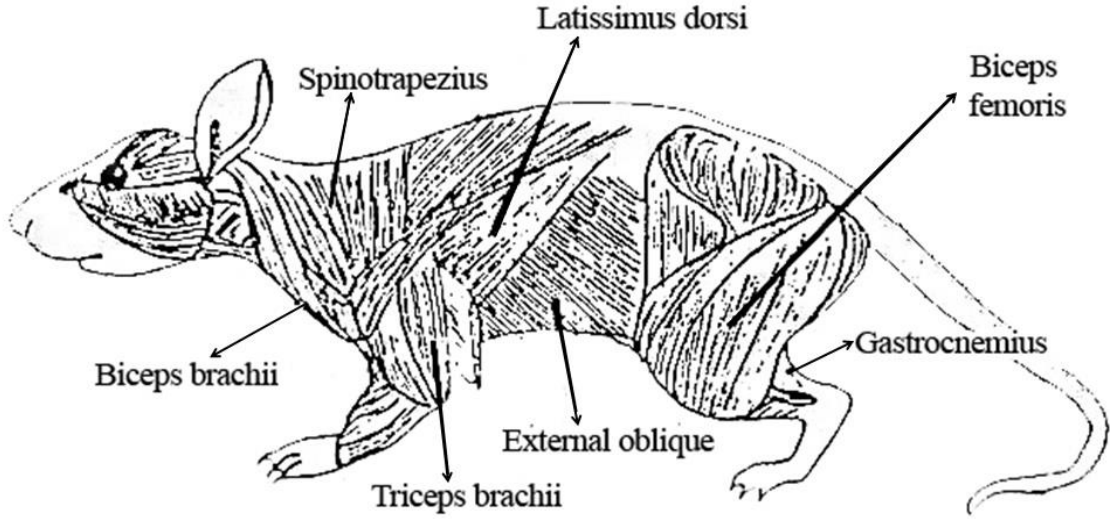
Aposinin farelerde oral uygulamasında ise çok düşük toksisiteye (LD50:9g/kg) sahiptir.³⁶

2.3.Gastrocnemius Kası

Gastrocnemius kası, epicondylus lateralis ve epicondylus medialis femoris'ten *Caput laterale* ve *Caput mediale* olmak üzere iki baş şeklinde başlayan bacağın arka tarafındaki en yüzeysel ve en geniş kastır.⁵² *Caput laterale* ve *Caput mediale*'nin kirişi tibia'nın orta hattında birleşerek aşağı doğru uzanan bir tendo oluşturur ve bacağın ortalarına doğru geniş bir aponevroz ile sonlanır. Kasın ön tarafında yer alan aponevroz, aşağı doğru daralarak *Tendo musculi gastrocnemii* oluşturur. Bu tendonun derininde bulunan *M.soleus*'un kirişiyle birleşerek *Tendo calcaneus communis*'i oluşturur ve *Tuber calcanei*'ye yapışarak sonlanır. *Tendo calcaneus communis*'in şekillenmesinde *M.biceps femoris*'in, *M.semitendinosus* ve *M.flexor digitorum superficialis*'in aponevrotik uzantıları da yer alır. *Caput laterale*'nin başlama yerinde ise *Fabella* olarak adlandırılan sesamoid bir kemik bulunabilir.

Gastrocnemius kası ayak ekleminin *Articulatio pedis* ekstensoru, *Articulatio femorotibialis* ise siniri olan *N.tibialis* tarafından innerve edilerek fleksoru şeklinde çalışır.

İskelet kaslarında bulunan lifler hızlı ve yavaş seğirme olarak sınıflandırılabilir. *Gastrocnemius* kasında bulunan lifler ise bu iki özelliği bir arada bulundurmaktadır(Şekil 2.6).



Şekil 2. 6. Ratta Gastrocnemius kasının lateralden görüntüsü

2.4.Serbest Radikaller

Maddenin yapı taşı olan atom; proton, nötron ve çekirdek çevresinde bulunan elektronlardan oluşur.⁵³ Çekirdek çevresindeki bu elektronlar orbital olarak adlandırılan bölgede çift olarak bulunurlar.⁵⁴

Dış orbitalinde eşleşmemiş bir elektronu olan atom ya da molekül serbest radikal olarak adlandırılır. Serbest radikaller ise genellikle kararsız ve çok reaktiftirler.⁵⁵ Serbest radikallerin reaktif olması ise diğer moleküllerle elektron alışverişi şeklinde etkileşimde bulunabilirler. Bundan dolayı da serbest radikaller oksidan ya da redüktan olarak davranabilirler ve bu reaktivite özelliklerinden dolayı da yarılanma ömürleri çok kısadır.⁵⁶

Serbest radikaller, organizmada aerobik solunum gibi metabolizma sırasında oluşabildiği gibi patolojik durumlarda da (iskemi, hemorajiler, allerji, enfeksiyonlar, entoksikasyonlar, hava kirliliği, radyoaktiviteye maruz kalma, stres ve yaşlanmaya benzer birçok nedenler) meydana gelebilir. Yan ürün olarak açığa çıkan bu serbest radikaller; karbonhidrat, protein, lipid ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi organizmadaki önemli bileşiklerin yapılarının bozulmasına sebep olurlar.^{57,58}

Serbest radikaller üç yolla şekillenebilir,⁵³

1. Bir molekülün kovalent bağının homolitik şekilde yıkılması ile,
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile,
3. Normal bir moleküle bir elektron eklenmesiyle,

Oksijenden oluşmuş radikaller ise biyolojik sistemlerin en önemli serbest radikalleridir. Dış yörüngesini oluşturan p orbitalinde eşleşmemiş iki elektrona sahip oksijen molekülü “biradikal” olarak adlandırılır ve her zaman serbest radikale dönüşmeye yatkındır. Bundan dolayı da karşımıza sıkça çıkan moleküler oksijenin reaksiyonları sonucu “serbest oksijen radikalleri” ya da diğer adıyla “reaktif oksijen türevleri (ROT)” denilen sınıfı oluşturmaktadır. Bu sınıftaki başlıca serbest radikaller; hidroksil ($\bullet\text{OH}$), hidrojenperoksit (H_2O_2), süperoksit ($\text{O}_2\bullet^-$), hidrojen (H^+), peroksit radikali (HO_2), nitrojenoksit (NO) ve nitrojendioksit (NO_2)’tir. Serbest radikaller ise biyokimyasal reaksiyonları (mitokondriyal enerji metabolizması, solunum, prostaglandin sentezi, detoksifikasyon) katalizlemede rol alırlar.^{59,60}

2.4.1.Serbest Radikal Çeşitleri

Serbest radikal çeşitleri Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2. 1. Serbest radikal türleri

Oksijen kaynaklı radikaller		Oksijen kaynaklı olmayan radikaller
Potansiyel oksijen radikalleri	Reaktif oksijen türevleri	
Süperoksit radikali (O_2^-)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)	Karbon kaynaklı radikaller Triklor metil (CCL)
Hidroksil radikali ($\text{HO}\bullet$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Sülfür kaynaklı radikaller Thiyl ($\text{RS}\bullet$)
Peroksil radikali ($\text{ROO}\bullet$)	Peroksinitrit (OONO-)	Nitrojen kaynaklı radikaller Fenildiazin ($\text{C}_6\text{H}_2\text{N:N}$)
Nitrik oksit ($\text{NO}\bullet$)		Geçiş metal kompleksleri $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$, $\text{Cu}^{+3}/\text{Cu}^{+2}$
Alkoksil radikali ($\text{RO}\bullet$)		

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Tüm aerobik hücrelerde kararlı durumdaki oksijenin suya dönüşmek amacıyla bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir. Çok toksik olmayan bu radikal direkt olarak zarar vermez. Bu radikalin asıl önemi geçiş metallerinin indirgeyicisi olan hidrojen peroksitin (H_2O_2) kaynağı olmasıdır. Süperoksit radikali ise nitrik oksitle reaksiyona girerek toksik ürün olan peroksinitriti ($ONOO^-$), azot dioksit (NO_2), hidroksil radikali ($\bullet OH$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi ürünlere dönüşebilen peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturur.



Süperoksit radikalının diğer bir meydana geliş şekli ise Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile olmaktadır. Bu reaksiyonda indirgenmiş geçiş metallerinin reversibl ootoksidasyonu ile meydana gelebilmektedir.^{1,61}



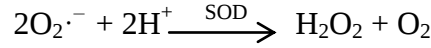
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit tek başına serbest radikal değildir. Öncelikle süperoksitin etrafından bir elektron ya da moleküler oksijenin etrafındaki moleküllerden iki elektron alması ile peroksit oluşur. Peroksit molekülü ise süperoksit dismutaz (SOD) enzimi katalizörlüğünde hidrojen molekülü ile birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur.^{62,63}

Serbest radikal olmayan hidrojen peroksit kararsız yapıda olup, biyolojik zarlara nüfuz edebilme ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesine katkı sağladığı için önemlidir. Hidrojen peroksit süperoksit anyon radikaliyle geçiş metal iyonlarının bulunduğu durumda hızlıca gerçekleşen bir reaksiyonla en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali çeşiti olan hidroksil radikalini de oluşturmak üzere kolaylıkla

yıkılabilmektedir.⁶⁴ Diğer bir önemli fonksiyonu ise hücre içi sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır. Hücre membranlarını kolaylıkla geçebilen hidrojen peroksit uzun ömürlü bir oksidandır.^{65,66}

Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl üretim reaksiyonu ise süperoksitin dismutasyonu ile gerçekleşir.⁶⁵



Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot-}$)

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitten Fenton Reaksiyonu ve Haber-Weiss Reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (Tablo 2.2). Bununla birlikte suyun da yüksel enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla da hidroksil radikali oluşur. Yarılanma ömrü çok kısa olan hidroksil radikali, oldukça reaktif ve toksik bir yapıya sahiptir. Oluştugu yerde büyük hasarlar meydana getiren bu radikal tiyoller ve yağ asitleri gibi farklı moleküllerden bir proton kopararak yeni radikal oluşumuna ve oksidatif hasar'ın meydana gelmesine neden olur.^{1,67}

Tablo 2. 2. Haber-Weiss ve Fenton Reaksiyonu⁶⁸

Haber-Weiss ve Fenton Reaksiyonu			
$H_2O_2 + Cu^+/Fe^{+2}$	$\longrightarrow$	$OH^{\cdot} + OH^- + Cu^{+2}/Fe^{+3}$	Fenton Reaksiyonu
$Cu^{+2}/Fe^{+3} + O_2^{\cdot-}$	$\longrightarrow$	$Cu^+/Fe^{+2} + O_2$	
$O_2^{\cdot-} + H_2O_2$	$\longrightarrow$	$OH^{\cdot} + OH^- + O_2$	Haber-Weiss reaksiyonu

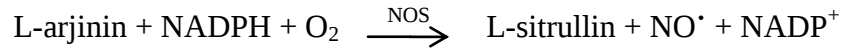
Singlet Oksijen (1O_2)

Singlet oksijen eşleşmemiş elektron içermediği için serbest radikal değildir ama serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olduğundan radikal sınıfında yer alan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijende bulunan eşleşmemiş elektronlardan birine verilen enerji ile bulunduğu orbitalden başka orbitale veya kendi spininin tersi yönünde

oluşan hareketi ile meydana gelir.⁶⁹ Singlet oksijenin membranda bulunan yağ asitleriyle direkt olarak reaksiyona girip lipid peroksitlerini oluşturur.⁷⁰

Nitrik Oksit (NO·)

Kimyasal olarak azot oksit veya nitrojen monoksit olarak da adlandırılan nitrik oksit, L-argininin sitrulline dönüşümü sırasında oluşan bir ara üründür. Nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi ile üretilir. Nitrik oksit renksiz ve toksik bir gazdır.⁷¹



NO· eşleşmemiş bir elektrona sahip olduğu için oksijen, superoksit radikalleri ve geçiş metalleriyle hızlıca reaksiyona girebilen, yarı ömrü çok kısa olan bir moleküldür. Nitrik oksit (NO·) Fe-S proteininden demiri çıkarıp yerine kendisi bağlanır. Bu durumda Fenton reaksiyonunu başlatır ve bu reaksiyonla karsinogenesizde rol alır. Nitrik oksit, süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyona girerek daha oksidan ajan olan peroksinitrite (ONOOH-) dönüşür. Oksidan ajan olan peroksinitrit radikal olmamasına rağmen reaktif olan •OH radikalini meydana getirir.^{71,72}

Buna ek olarak peroksinitrit, nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) oluşturmak üzere metabolize edilir. Nitrit oksit (NO·) radikalinin ise stabil son ürünleri nitrit ve nitrat molekülleridir. Plazma gibi çoğu vücut sıvısında nitritin çoğu nitrata dönüşür. Nitrik oksit (NO·) elektriksel alanda yüksüz olmasından dolayı reseptöre ihtiyaç duymadan kolayca membrandan geçebilir ve bir dizi nitrojen dioksitlere dönüşebilir.⁶²

2.4.2.Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller, hücrelerin normal metabolik aktivitesi içerisinde oksidasyon veya redüksiyonu sırasında oluşabileceği gibi diğer dış kaynakların etkisi ile de oluşabilir. Elektriksel olarak da pozitif (+), negatif (-) veya nötr (0) olabilirler. Radikal olmayan bir molekülün serbest radikal ile reaksiyona girmesi sonucu yeni bir serbest radikal oluşur, bu özellik ise serbest radikallerin bir dizi zincir reaksiyonu şeklinde

devam etmesini sağlar. Hücrelerde serbest radikaller ise endojen ve ekzojen olmak üzere iki şekilde sınıflandırılırlar(Tablo 2.3).^{73,74}

Tablo 2. 3. Hücrede bulunan serbest radikallerin kaynakları

ENDOJEN KAYNAKLAR	EKSOJEN KAYNAKLAR
Mitokondriyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler:	Güneş ışığı
Ksantin oksidaz	X-ışınları
Triptofan dioksijenaz	Isı şoku
Galaktoz oksidaz	Glutasyonu okside eden maddeler
Siklooksijenaz	Ortam havası:
Lipooksijenaz	Sigara dumanı
Mono aminooksidaz	Ozon
Fagositik hücreler:	Kükürtdioksit
Nötrofiller	Egzos gazları
Monosit ve makrofajlar	
Eozinofiller	
Endotelyal hücreler	
Oto-oksidasyon reaksiyonları (Fe^{+2} , epinefrin)	

2.4.3.Serbest Radikallerin Hücresel Elemanlar Üzerine Etkileri

Lipidler Üzerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Lipid reaksiyonu, doymamış yağ asitlerinin süperoksit radikalleri tarafından alkoller, aldehitler, peroksitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasını kapsayan reaksiyonlar dizisidir.⁷⁵

Serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitleri hassastırlar ve savunma mekanizmalarının kapasitesini aşan durumlar da serbest radikaller membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağlarıyla reaksiyona girerler buna “lipid peroksidasyonu” denir.⁶⁶

Peroksidasyon, çoklu doymamış yağ asidi molekülünün metilen grubundan bir H^+ atomunun reaktif oksijen türlerince çıkarılmasıyla başlayabilir ve lipid radikali oluşur. Oluşan bu lipid radikale oksijen molekülünün eklenmesiyle lipid peroksil radikali meydana gelir. Birçok yıkım sonrasında son ürün olan, mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşik olan malondialdehid (MDA) meydana gelir ve bu bileşik hücreler için aşırı toksiktir. Kan ve dokularda bulunan MDA, lipid peroksidasyonun belirlenmesinde çok sık kullanılan bir parametredir.^{76,77}

Proteinler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller doğrudan proteinler üzerine hasar oluşturur ve bu oluşturduğu hasarın derecesini ise proteini oluşturan aminoasit kompozisyonu belirler. Proteinlerin yapılarını oluşturan aminoasitler doymamış bağ ve sülfür içeriyorlarsa serbest radikaller ile daha yüksek reaktiviteye sahip olduğundan daha kolay reaksiyona girerler. Bu aminoasitlere örnek olarak histidin, fenil alanin, metionin, tirozin, triptofan ve sistein verilebilir. Bunlar serbest radikaller ile etkileşime girerek dimerler ve büyük agregatlar meydana getirirler. Oluşan bu protein hasarının derecesi ise proteinin hücresel lokalizasyonu veya serbest radikalın toksisite gücüne göre değişebilir.^{66,78}

Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

İyonize radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'da meydana getirdikleri hasarlar sonucunda hücrede mutasyonlara ve ölüme neden olabilirler. Aktif formdaki nötrofillerden salınan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek hücre çekirdeğine ulaşır. Hücre çekirdeğine ulaşan hidrojen peroksit (H_2O_2) DNA hasarına, hücrede disfonksiyona ve hücrenin ölümüne neden olabilir.^{66,79} Hidroksil radikalide yine DNA'da kolaylıkla hasarlara neden olabilir. Bu radikale karşı özellikle, primidin C4-C5 çift bağı çok hassastır. Hidroksil radikalinin bu bağa olan saldırısı sonucu urasil glikol, timin glikol, 5-hidroksideoksiüridin, 5-hidroksideoksisitidin, üre kalıntısı ve

hidantoin gibi oksidatif pirimidin hasar ürünleri oluşur. Pürinlerde hidroksil radikalinden aşırı şekilde etkilenirler ve bu etkiler sonucunda 8-hidroksi deoksiguanozin ve 8-hidroksi deoksiadenozin formamidopirimidin ürünleri oluşur. Programlanmış hücre ölümüne ve DNA'nın parçalanmasına yol açan poli sentetaz enziminin (ADP-riboz) aktivasyonunu yine serbest radikallerin saldırısı olmuşturmaktadır.⁸⁰⁻⁸²

Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Glukoz gibi monosakkaritler otooksidasyona uğraması sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2), okzoaldehid ve peroksitler meydana gelir. Glikasyon olarak adlandırılan karbonhidratların proteinlere bağlanması reaksiyonunda serbest radikaller proteinlerin hasara karşı duyarlılığını artırmaktadır. Okzo aldehitler; DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilirler veya çapraz bağ oluşturabilirler. Bu bağlanma özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstererek kanser ve yaşlanma olaylarında etki göstermektedirler.⁷⁴

2.5.Antioksidan Savunma Mekanizması

Sürekli olarak organizmada meydana gelen metabolik olaylar sırasında serbest radikaller oluşur. Bu serbest radikallerin etkilerinin azaltılması veya tamamen etkisiz hale getirilmesini sağlayan savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri denir.^{1,83} Antioksidanlar, lokal oksijen miktarını azaltarak, hidroksil radikallerini ($HO\cdot$) temizleyip lipid peroksidasyonunun oluşmasını önlemesiyle organizmayı serbest radikal etkilerinden korumaktadırlar. En önemli özellikleri ise düşük konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu azaltırlar veya inhibe de ederler.⁸⁴

Antioksidanların Sınıflandırılması;

Antioksidanlar genel olarak 4 başlık altında sınıflandırılabilir;⁸⁵

- 1- Yapısal özelliklerine (enzimatik, enzimatik olmayan),
- 2- Çözünürlüklerine (suda çözünenler, yağda çözünenler),
- 3- Kaynaklarına (endojen, ekzojen),

4- İnsan vücudundaki yerleşimlerine (intraselüler, ekstraselüler) göre sınıflara ayrılırlar.

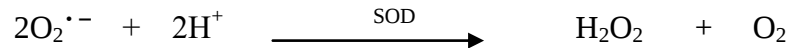
Tablo 2. 4. Antioksidanların sınıflandırılması^{86,87}

Endojen Antioksidanlar	
Enzimatik	Nonenzimatik
Süperoksit dismutaz (SOD)	Albümin
Katalaz (CAT)	Askorbat (vit C)
Glutasyon S-transferaz (GST)	Bilirübin
Glutasyon redüktaz (GR)	Ferritin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Flavonoidler
Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px)	Glutasyon (GSH)
	Laktoferrin
	Melatonin
	Seruloplazmin
	Sistein
	Transferrin
	Ürat
	α -Tokoferol (Vit E)
	β -Karoten (Vit A)
Eksojen Antioksidanlar	
Vitamin Eksojen Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar
Askorbik asit (Vitamin C)	Barbitüratlar
Folik asit (Vitamin B9)	Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferoksamin)
α -Tokoferol (Vitamin E)	Demir şelatörleri
β -karoten (Vitamin A)	Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
	Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
	NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokörleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)
	Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
	Nötrofil adezyon inhibitörleri
	Rekombinant süperoksit dismutaz
	Sitokinler (TNF ve IL-1)
	Trolox-C (vitamin E analogu)

2.5.1.Endojen Antioksidanlar

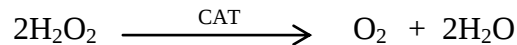
2.5.2.Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD): Organizmadaki serbest radikallere karşı ilk savunma basamağı olan süperoksit dismutaz (SOD) ilk kez Mccord ve Fridovich tarafından 1968 yılında tanımlanan metalloenzim yapısında bir enzimdir. Bu enzim süperoksit radikalini, H₂O₂ ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizler.^{88,89} Buna bağlı olarak hidroksil radikali ve süperoksit radikallerinden H₂O₂ oluşumunu meydana getirerek oksijen radikallerine göre daha çok reaktif ve toksik etkiye sahip olan HO[•] radikalinin ortamda birikmesini önler.^{72,73}



Serbest radikalleri substrat olarak kullanan enzim sadece SOD'dur. SOD'un organizmada 2 izoenzimi bulunmakta olup, taşıdıkları prostetik grup (metallere) ve lokalizasyonlarına göre de adlandırılırlar. Bu izomerlerden en çok bulunanı Cu – Zn olup sitozolde bulunur. Diğerisi ise Mn içeren tipi olup mitokondride bulunur ve nükleer DNA tarafından kodlanarak mitokondriye taşınır.^{90,91}

Katalaz (CAT): Katalaz, peroksizom yapısındaki membrana bağlı bir enzimdir ve bu enzim H₂O₂'ten su ve oksijen oluşumunu katalizler.

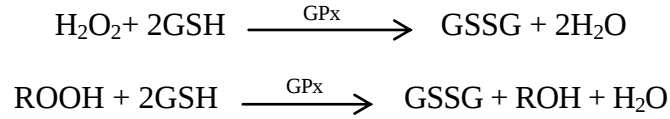


Katalaz enzimi ilk defa 1901'de Leew tarafından doğada bol miktarda olduğu bulunmuş ve 1937'de ise Summer ve Dounce tarafından karaciğer dokusundan kristal şeklinde izole edilmiştir. Yapısında dört hem grubu bulunduran CAT 248 kDa molekül kütlesine sahip bir hemoproteindir. Homotetramerik yapıda olan bu enzim dört alt ünitelerden oluşup her üniteye bir hem ve NADPH molekülüne sahiptir. Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde CAT aktivitesi yüksektir.^{92,93}

Kan, kemik iliği, muköz membran, karaciğer ve böbrek gibi canlı sistemlerde bulunan CAT enzimi, antioksidan özellik göstermektedir. Moleküler oksijen varlığında ise hidrojen peroksitin (H_2O_2) ve ROOH gibi peroksitlerin hücrede oluşturacağı hasarlara karşı korumaktadır.⁹⁴

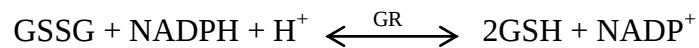
Glutasyon peroksidaz (GPx):

Hücrenin sitozolünde bulunan GPx, sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından meydana gelen hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik peroksitleri ortadan kaldıran bir hidroperoksidazdır. Aktif bölgesinde 4 adet selenyum ihtiva eder. Eritrositler ve diğer dokularda oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lipid peroksitlerin redükte glutatyonla elimine edilerek membran lipidlerini ve hemoglobini oluşabilecek oksidasyona karşı korumaktadır. Eritrositlerdeki oksidatif stresi en iyi engelleyen antioksidan glutasyon peroksidazdır. Bu antioksidan enzimin aktivitesinin azalmasına bağlı olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) seviyesi artar ve bu durumda şiddetli bir hücre hasarı meydana gelir. Glutasyon peroksidaz reaksiyonları ise aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir.⁹⁵



Glutasyon peroksidazın önemli rol oynadığı diğer bir yerde fagositik hücrelerdir. Fagositik hücrelerde fagositoz sırasında oluşan serbest radikallerin peroksidasyonundan kaynaklanan hücre hasarını engellemektedir.⁹⁶

Glutasyon redüktaz (GR): İlk kez 1951 yılında tanımlanan glutasyon redüktaz enzimi disülfür substratları ile indirgenmiş pirimidin nükleotidleri arasında elektron tranferasını sağlar.

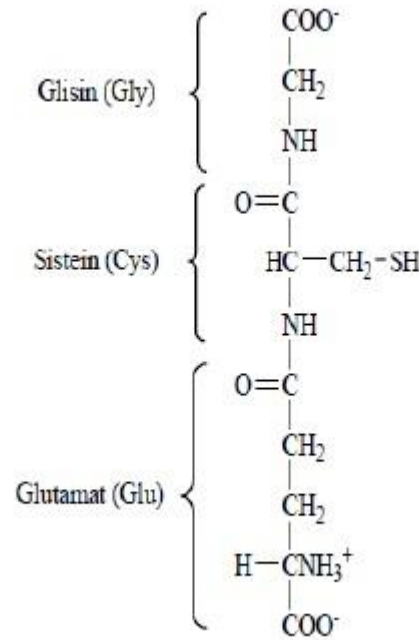


Glutasyon redüktaz, okside glutasyon'u (GSSG) hızlı bir şekilde redükte glutasyon'a çevirerek hücreyi peroksitlerin oluşturacağı hasarlara karşı korur. Her

hücrede bulunan GR hücrenin fonksiyonel proteinlerini oksidan ajanlara karşı korumaktadır. Eritrositlerde bulunan GSH/GSSH oranı yaklaşık olarak 500/1'dir. GR ise bilinen en önemli görevi hücredeki bu oranı korumaktır. Bu oran düşer ise eritrositler hemolize uğramaktadır.^{97,98}

2.5.1.2.Non-enzimatik Antioksidanlar

Glutatyon (GSH): Tripeptit yapıda düşük molekül ağırlıklı olan glutatyon (Şekil 2.7); sistein, glutamik asit, ve glisinden oluşur. Önemli intrasellüler bir tiyol bileşiği olup gamma-glutamil köprüsü ve sülfidril grubu olmak üzere iki şekilde oluşmaktadır. İlk kez 1888'de De Rey Pailhade tarafından izole edilen bir enzimdir. Doğada çok yaygın olarak bulunan bu enzim 1921 yılında da Hopkins tarafından kristalleştirilmiştir. 1929 yılında açık formülü yazılan glutatyon 1935 yılında ise Harrington ve Mead tarafından γ -L-glutamil-L-sisteil-glisin olarak sentez edilmiştir.^{99,100}



Şekil 2. 7. Glutatyonun yapısı¹⁰¹

Glutatyonun dokulardaki düzeyini gama glutamil transferaz (GGT) ayarlar. Endojen ve eksojen bazı bileşiklerle konjuge olan glutatyon, lipid peroksidasyonla konsantrasyonu azalırken, okside glutatyonun (GSSG) konsantrasyonu artmaktadır.

Glutatyonun yapısında bulunan sülfhidril ($-SH$) grupları hücre hasarına neden olan oksitleyici ajanların etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Glutatyon ile glutatyon peroksidaz (GPx) arasındaki ilişki ise şöyledir; glutatyonun yükseltgenmesi selenyum içeren glutatyon peroksidaz ile olurken, glutatyon peroksidazın (GPx) indirgenmesinde ise glutatyon görev almaktadır.

Glutatyon, karaciğer, kan hücreleri, plazma, akciğer, böbrekler, beyin gibi organlarda bulunur. Bu organlar arasında özellikle karaciğerde yüksek düzeyde bulunmaktadır. Kanda bulunan glutatyonun ise neredeyse tamamı eritrositlerde yer alır ve eritrositleri oksidatif hasarlara karşı korur.^{99,102} Üç aşamada gerçekleşen eritrositlerdeki glutatyon, bu oluşum aşamalarından herhangi birinde gerçekleşecek bir genetik bozulma sonucu glutatyon (GSH) yetersizliğine neden olur.^{76,103,104}

Hücredeki glutatyonun görevlerini genel olarak üç başlık altında toplayabiliriz;

1. Bir antioksidan olmasından dolayı direkt serbest radikal temizleyicisi,
2. Detoksifikasyon sırasında GSH-S transferazlar için kofaktör olması,
3. Glutamini GSH'dan diğer aminoasitlere transfer eden gamaglutamil transpeptidazlar için substrat olarak kullanılır.

Glutatyon, hücrenin oksidasyon-redüksiyon dengesinde önemlidir. Toksik metabolitleri hücreden uzaklaştırır ve sülfhidril grubunun ($-SH$) ise devamlılığını sağlar.¹⁰⁵

2.5.3.Ekzojen Antioksidanlar

Ekzojen antioksidanlar aşağıda sıralanmıştır.

- **Barbütiratlar**
- **Demir Redoks Döngüsünün İnhibitörleri:** Deferroksamin, seruloplazmin.
- **Demir Şelatörleri**
- **Diğer Nonenzimatik Serbest Radikal Toplayıcıları:** Albumin, mannitol, DMSO.

- **Endojen Antioksidan Aktiviteyi Arttıran Maddeler:** Asetilsistein, Glutasyon peroksidaz aktivitesini arttıran ebselen.
- **Ksantin Oksidaz İnhibitörleri:** Allopürinol, folik asit, oksipürinol, pterin aldehid, tungsten.
- **NADPH Oksidaz İnhibitörleri:** Adenozin, cetiedil, difenilin iodunyum, kalsiyum kanal blokerleri, lokal anestezikler, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar.
- **Nötrofil Adezyon İnhibitörleri**
- **Recombinant süperoksit dismutaz**
- **Sitokinler:** TNF ve interlökin-1
- **Soya Fasulyesi İnhibitörleri:** Ksantin dehidrojenazın proteolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.
- **Troloks-c:** E vitamini analogu^{86,87}

Antioksidanların etki şekilleri dört başlık altında incelenebilir;

1.Toplayıcı (scavenging) etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyip tutma veya reaktif olamayan daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürmesi,

2.Bastırıcı (quencher) etki: Serbest oksijen radikallerine bir yeni hidrojen aktararak etkisini azaltır veya inaktif şekle dönüştürmesi,

3.Onarıcı (repair) etki: Genellikle DNA’da meydana gelen hasarların onarılmasındaki süreçte bu etki geçerlidir. Okside proteinlerin proteolitik enzimlerle, membran lipidlerini lipazlar, açıl transferazlar ve peroksidazlar ile ortadan kaldırılması,

4. Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlamaları sonucunda reaksiyon zincirlerinin devamlılığının kırılmasına denir.¹⁰⁶

2.6.Oksidatif Stres Parametreleri

Oksidatif stres; hücrelerde meydana gelen serbest radikaller ile antioksidanların arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulmasıdır. Bu bozulma sonucunda canlılar için büyük önem arz eden reaktif oksijen metabolitleri oluşmaktadır. Oluşan serbest radikaller antioksidan kapasitesini aştığı zaman lipid, protein ve nükleik asitlerde olmak üzere birçok moleküle zarar verir ve hücrelerde oluşan oksidatif hasar sonucunda da fonksiyon bozuklukları meydana gelir.^{107,108} Doku hasarları ve DNA mutasyonlarına neden olan serbest radikaller kanser, alerji, ateroskleroz, diyabet, sepsis, infertilite, böbrek yetmezliği, yaşlanma gibi 100'den fazla hastalığa neden olduğu bilinmektedir.^{109,110}

Bunun yanısıra oksidatif metabolitler düşük konsantrasyonlarda da mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları önlemede ve mitotik aktivasyon için gerekli olan enzimlerin aktivasyonunda yer almalarıyla da biyolojik sistemde yararlı etkilerinden de bahsedilebilir.⁸⁵

Tablo 2. 5. Oksidatif stres parametreleri

Oksidatif Stres Parametreleri	
1. Antioksidan savunma sisteminin ölçümü	A) Antioksidan enzimlerin değerlendirilmesi Süperoksit dismutaz (SOD) Glutasyon peroksidaz (GPx) Katalaz (CAT) Glutasyon-S-transferaz (GST) Glutasyon redüktaz (GR) B) Total antioksidan aktivitesinin belirlenmesi C) Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların ölçümü (LMWA) Alfa-tokoferol Askorbik asit Glutasyon Melatonin
2. Enzim kofaktörlerinin ölçülmesi	Cu, Zn, Mn, Se, Fe elementleri
3. Oksidatif hasar biyobelirteçlerinin ölçümü	A) Lipid peroksidasyon ürünlerinin belirlenmesi Malondialdehit (MDA) Aldehitler B) Protein hasarının belirlenmesi C) DNA hasarının belirlenmesi 8-hidroksi-2'-guanozin (8-OHdG)
4. Radikallerin ölçümü	Elektron paramagnetik rezonans spektroskopisi (ERP)

3.MATERYAL VE METOT

3.1.Materyal

3.1.1.Analizlerde kullanılan cihaz ve malzemeler

Çalışmada derin dondurucu (-20 °C Bosch), soğutmalı santrifüj (Hettich Zentrifugen Rotina 38 R), pH metre (Thermo Mettler Toledo Inlab), hassas terazi (Shimadzu), Elisa okuyucu (Biotek µQuant), Otomatik pipetler (Eppendorf), magnetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001 Expert Pro-ISM), distile su cihazı (GFL 200112), çalkalayıcı su banyosu (GFL 1083), TissueLyser (Qiagen), vortex (IKA-MS2 Minishaker), clevenger aparatı, etüv (Ecocell), quartz plate (Hellma), makas, 0.5 cm biopsy punch, bistüri ve pens kullanıldı.

3.1.2.Malzeme ve kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma ve Merck firmasından temin edildi. Aposinin (Sigma St, Louis, MO, USA) litaretürden faydalınarak % 10'luk DMSO ile çözündürülüp 20 mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.¹¹¹

3.1.3.Hayvan materyali

Bu çalışmada kullanılan ratlar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) tarafından sağlandı. Çalışma izni için 29.11.2017 tarihli 36643897-000-E.1700331428 sayılı etik kurul kararı ile onaylanmıştır.

Bu çalışma için 8-9 haftalık 32 adet canlı ağırlıkları 250-300 g olan erkek Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Ratlar 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda 22°C (±2) olan ortamda tutuldular. Ortama adaptasyon sağlamaları için bir hafta süreyle ratlar çalışma boyunca standart rat yemi ve musluk suyu ile ad libitum beslendiler.

3.2. Metod

Çalışmada 32 adet erkek Sprague-Dawley cinsi ratlar rasgele seçilip tartılarak ortalama ağırlıkları eşitlenerek her grupta 8 rat olacak şekilde 4 gruba ayrılarak aşağıda tanımlandı.

Kontrol grubu (K): Anesteziye alınmadan 30 dakika önce 0.5 mL % 10'luk DMSO i.p. olarak uygulandı ve 4 saat anestezi sonrasında doku (sol alt ekstremiteden) ve kan örnekleri alındı.

İskemi/Reperfüzyon grubu (İ/R): Anesteziye alınmadan 30 dakika önce 0.5 mL %10'luk DMSO i.p. olarak uygulandı. Anestezi altında sol alt ekstremiteye 2 saat iskemi oluşturuldu, ardından turnikeler açılıp 2 saatlik reperfüzyon oluşturuldu ve sonrasında doku (sol alt ekstremiteden)¹⁶⁰ ve kan örnekleri alındı.

Aposinin grubu (AP): Anesteziye alınmadan 30 dakika önce 20 mg/kg Aposinin i.p. olarak uygulandı ve 4 saat anestezi sonrasında doku (sol alt ekstremiteden) ve kan örnekleri alındı.

Aposinin+İskemi/Reperfüzyon (AP+İ/R): Anesteziye alınmadan 30 dakika önce 20 mg/kg Aposinin i.p. olarak uygulandı. 30 dakika sonra anestezi altında alt ekstremiteye turnike uygulanıp 2 saat iskemi oluşturuldu (ısının düşük olması ve pençelerin siyanotik olması iskeminin olduğu anlamına geldi), ardından turnikeler açılıp 2 saatlik reperfüzyon oluşturuldu (pençelerin pembeleşmesi ve ısı artışı reperfüzyonun sağlandığını gösterdi) ve sonrasında doku (sol alt ekstremiteden) ve kan örnekleri alındı.

3.2.1. Deneysel Uygulamalar ve Numunelerin Alınması

Tüm ratlar Ksilazin (8 mg/kg) ve Ketamin (60 mg/kg) ile anestezi altına alındı. Kontrol ve aposinin grubu hariç diğer 2 gruptaki ratların sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp 2 saat iskemi oluşturuldu (ısının düşük olması ve pençelerin siyanotik olması

iskeminin oluştuğu anlamına geldi), ardından turnikeler açılıp 2 saatlik reperfüzyon oluşturuldu (pençelerin pembeleşmesi ve ısı artışı reperfüzyonun sağlandığını gösterdi) oluşturuldu (Şekil 3.1).

Ksilazin (8 mg/kg) ve Ketamin (60 mg/kg) ile anestezi altına dekapitasyon işlemi uygulanarak kan örnekleri lityum heparinli tüplere alındı. Alınan kanlar lityum heparinli tüplere aktararak, 3000 rpm’de, +4 °C’de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrılıp, biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -20 °C’de deep freezde saklandı.

Sol alt ekstremitede bulunan *Gastrocnemius* kasına ulaşarak kas dokusunun bir kısmı biyokimyasal analizler için alınarak biyokimyasal analizleri yapılncaya kadar -20 °C’de deep freezde saklandı. Alınan kas dokusunun bir kısmı ise % 10’luk formaldehit solusyonu içerisinde histopatolojik analizler yapılncaya kadar saklandı.



Şekil 3. 1. Turnike ile sol alt ekstremitede iskemi oluşturulması

3.2.2.Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için gerekli miktarda *Gastrocnemius* kas dokusu tartılarak analizlere göre uygun tampon çözeltiler seçilerek sulandırılıp, Qiagen TissueLyserII kullanılarak homojenize edildi. Analizlerde belirtilen rpm ve sürede örnekler santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. GPx ve SOD aktivitelerini gram protein cinsinden ifade edebilmek için kas dokusunda protein düzeyleri Lowry ve ark.¹¹²,nın metoduna göre ölçüldü.

1) Plazmada MDA tayini:

Çözeltiler: TBA çözeltisi (% 0.67), % 20'lik Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ve n-bütanol.

Prensip: Tiyobarbütirik asit tepkimesi kullanılarak lipid içerik, düşük pH'da TBA varlığında ısıtılarak 535 nm'de en yüksek pik oluşturan stabil kırmızı-pembe renk elde edildi. Bu rengi bir MDA molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojen verir. MDA'nin bir kısmı peroksidasyon sırasında oluşurken, büyük çoğunlukta, ortam asitleştirildikten sonra uygulanan ısıtma aşamasında lipid peroksidlerin yıkımlanması sonucu oluşur.¹¹³

Deneyin Yapılışı: Test işaretli tüpe 0.5 mL plazma konulduktan sonra üzerine 2.5 mL TCA çözeltisi, kör işaretli diğer bir tüpe ise 3 mL TCA eklendi. Her iki tüpe de birer ml TBA çözeltisi ilave edildi. Yarım saat 95 °C'de su banyosunda bekletildi. Daha sonra buzlu su içerisinde hızla soğutuldu. Tüplere 4'er mL n-bütanol ilave edildi ve karıştırıldı. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. n-bütanol tabakası ayrı bir tüpe alınarak, absorbans 535 nm'de spektrofotometrede okundu. Standart eğri kullanarak plazmadaki MDA düzeyleri hesaplandı.

2) Plazmada CAT tayini:

Prensip: Katalaz tayininde H₂O₂ ile plazmanın inkübe edilmesinden sonra ortamda kalan hidrojen peroksitin amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturması ve bunun spektrofotometrik ölçümü temeline dayanan bir metod kullanıldı.¹¹⁴

Deneyin Yapılışı: Fosfat tamponu ile 20 kez dilue edilmiş plazmanın/süpernatantın 0.2 mL'si, 1 mL substrat (60 µmol/L, pH: 7.4 sodyum potasyum fosfat tamponu içinde 65 mmol/mL H₂O₂) ile 37 °C'de 60 sn inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon 1 mL amonyum molibdat (32.4mmol/L) eklenerek durduruldu ve hidrojen peroksidin molibdatla oluşturduğu sarı renkli kompleksin absorbansı 405 nm'de köre karşı spektrofotometrede ölçülerek A numune'nin absorbans değeri elde edildi. A kör1'in absorbans değeri 1 mL substrat, 1 mL molibdat ve 0.2 mL plazmanın ilave edilmesi sonucu elde edilerek aşağıdaki formüle göre sonuçlar hesaplandı. Aşağıdaki formüle göre sonuçlar hesaplandı.

$$\text{Katalaz aktivite hesabı (kU/L)} = ((A \text{ kör1} - A \text{ numune}) / (A \text{ kör2} - A \text{ kör3})) \times 271$$

3) Plazmada GSH tayini:

Analizde kullanılan çözeltiler

Proteinsizleştirme çözeltisi: % 10'luk TCA çözeltisi, 400 mM Tris-HCl tamponu (pH: 8.9), 2.5 mM DTNB çözeltisi ve standart çözelti: 1 mM stok GSH çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden 5µM- 100µM arasında seyreltmeler yapılarak standart çözeltiler hazırlandı.

Plazmada glutatyon düzeyinin ölçülmesinde Tietze¹¹⁵ yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle göre plazma ile aynı hacimde eklenen TCA çözeltisi ile proteinsizleştirilmiş örneklerdeki glutatyonun hem sülfhidril hem de primer amino grubu 5,5-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile şiddetli kolorimetrik türevler oluşturur ve bu türevlerin oluşturduğu renk spektrofotometrik olarak saptandı.

Deneyin Yapılışı: TCA ile yapılan proteinsizleştirme işleminden sonra çökelti santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Üst fazda GSH tayini yapıldı.

Plazmada GSH Tayini: Örnek tüplere 200 µL distile su, 700 µL 400mM Tris-HCl, 100 µL 2.5 mM DTNB; kör tüplere 200 µL üst faz örnek, 700 µL 400mM Tris-HCl, 100 µL 2.5 mM DTNB; standart tüplere 200 µL GSH, 700 µL 400mM Tris-HCl, 100 µL 2.5 mM DTNB alınıp oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilerek absorbanslar spektrofotometrede 412 nm’de okundu.

Hesaplama: Serum glutatyon düzeyleri, glutatyon standart grafiği kullanılarak okunan absorbans değerlerinin karşılaştırılmasıyla sonuçlar hesaplandı.

4) Plazma AOPP tayini:

Prensibi: AOPP ölçümü Witko-Tarsat ve ark.¹¹⁶ tanımladığı yöntemle göre yapıldı. Bu yöntemle göre; AOPP oluşumu klorine oksidanların (kloraminler ve hipokloröz asit gibi) oluşumu ile indüklenmektedir. Bu sebeple konsantrasyonu da bunlara korele olarak değişir. AOPP konsantrasyonu ölçümünde bu ilişki nedeni ile Chloramine-T standart olarak kullanıldı.

Reaktifler:

Asetik Asit: % 96, v/v olacak şekilde hazırlandı.

Potasyum İyodür (KI): 1.16 mol/L olacak şekilde hesaplandı ve PBS (20 mmol/L, pH:7.4) ile 1 litreye tamamlandı.

PBS (20 mmol/L, pH:7.4) hazırlanması: Na₂HPO₄’den 5.796 gr, KH₂PO₄’den 0.52 gr ve NaCl’den 8.71 gr tartıldı ve distile su ile 1 litreye tamamlandı.

10 µl plazma/Chloramine-T standart sol. tüplere aktararak üzerlerine 160 µL PBS eklenip karıştırılarak 25 sn inkübe edildi. 20 µl %96’lık asetik asit eklenip 25 sn inkübe edildikten sonra üzerlerine 10 µl KI ilave edilerek 25 sn inkübe edildi. Blank ise 160 µl PBS+20 µl asetik asit+10 µl KI’den oluştu. Reaksiyon karışımının absorbansı

blank'e karşı 340 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Ölçülen AOPP konsantrasyonları Chloramine-T ünitesi ile $\mu\text{mol/L}$ olarak ifade edildi.

5) Plazma İMA düzeylerinin belirlenmesi

Plazma İMA düzeylerine David Bar ve ark.¹¹⁷ tarafından geliştirilen kolorimetrik metod kullanılarak bakıldı. Her numune için numune körü oluşturuldu. 200 μL plazma cam tüplere alınarak üzerlerine 50 μL %0.1'lik $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ eklenerek karıştırıldı. 10 dakika oda ısısında kobalt albumin bağlanmasının sağlanması için beklendi. Üzerine 50 μL renklendirici ajan olarak Dithiothreitol (DTT) (1.5 mg/mL) eklendi. Oda ısısında 2 dakika beklendi ve kobalt ve albumin arasındaki bağlanmayı durdurmak için 1 mL % 0.9' luk NaCl eklendi. Numune körüne DTT yerine 50 μL distile su kondu. Örneklerin absorbansları Biotek ELISA Readerda (Bio Tek $\mu\text{Quant MQX200}$ Elisa reader/USA) 470 nm'de sonuçlar ABSU absorbans ünitesi cinsinden değerlendirildi.

6) Plazma ve kas dokusunda SOD tayini:

Analizde kullanılan çözeltiler:

A) Ölçüm Karışımı: 0.3 mM Ksantin, 0.6 mM EDTA-150 μM NBT, 0.4 M Na_2CO_3 ; 1.2 g /L BSA (Bovin Serum Albumin)

B) SOD enziminin aktivitesini ölçmek için kullanılan çözelti (167 U/L Xanthine oksidaz): Hazır olarak temin edilen (1 mL'sinde 32 mg protein ve 0.3 U enzim ihtiva eden) enzimden 70 μL alındı ve üzerine 4 ml soğuk 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çözeltisi ilave edildi.

C) 2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Amonyum sülfat) : 1.0571 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ alındı, bir miktar distile suda çözüldü ve hacmi saf soğuk su ile 4 mL' ye tamamlandı. Bu çözelti taze olarak hazırlandı ve $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletilerek soğuk bir şekilde kullanıldı.

D) 0.8 mM CuCl_2 (Bakır klorür): 0.0136 g CuCl_2 alındı, bir miktar saf suda çözülüp hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Prensip: Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik asite dönüştürülüşünde oluşan süperoksit radikalleri, ortamda NBT'nin (nitrobluetetrazolium) varlığında NBT ile reaksiyona girerek 560 nm dalga boyunda, maksimum absorbans veren formazon bileşimini meydana getirirler. Eğer ortamda SOD enzimi varsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından H_2O_2 'ye dönüştürüldüğü için formazon oluşumu azalır ve buna bağlı olarak 560 nm'de ölçülen absorbans azalır. Absorbanstaki azalmanın miktarı bize SOD aktivitesi hakkında bilgi verecektir.

SOD' un ölçümü ve aktivitesinin belirlenmesi oluşan formazon miktarları dikkate alınarak geliştirilen formülle hesaplandı.¹¹⁸

Deneyin Yapılışı: 25 g doku alınır hazırlanan homojenat tamponu ile hacmi 2.5 mL'ye tamamlanarak ultraturaks ile 45 sn homojenize edildi ve 5000 G'de 60 dk santrifüj edilip süpernatantları kullanılmak üzere ayrıldı. Boş deney tüplerinin her birine 2.85 mL ölçüm tamponu konuldu. Test tüplerine 100 µL hazırlanan süpernatant/ sulandırılmış plazma eklenirken kör tüpüne 100 µL distile su eklendi. 50 µL Xanthine Oksidase çözeltisi tüm tüplere aktarıldıktan sonra 25 °C'de 20 dk inkübe edildi. Sonra tüm tüplere 1mL $CuCl_2$ ilave edilip, 560 nm'de reaktif solüsyonuna karşı okundu.

Hesaplama:

$$(EU/mg \text{ doku}) = (\Delta Akör - \Delta Anumune) / \Delta Akör$$

$$(U/mL \text{ plazma}) = (\Delta Akör - \Delta Anumune) / \Delta Akör$$

7) Plazma ve kas dokusunda Glutatyon peroksidaz (GPx) tayini:

Plazma ve kas dokusu homojenatında GPx aktivitesi Matkovics ve ark.¹¹⁹ metoduna göre ölçüldü.

Analizde kullanılan çözeltiler:

-Tampon I-Tris-HCl tamponu (50mM pH:7.6): 6.057 g Trishidroksi metilaminometan ve 0.372 gr EDTA-Na₂ ve 3.90 mL HCl alınıp toplam hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

-Tampon II- Tris tamponu (0.4M pH: 8.9): 48.46 g Trishidroksi metilaminometan alınarak hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı ve pH HCl ile 8.9'a ayarlandı.

-Red GSH Solüsyonu:6 mg Red Glutasyon alınarak hacim tampon I ile 10 mL'ye tamamlandı.

-CHPO: 5µL alınarak tampon I ile 10mL'ye tamamlandı.

-DTNB Solüsyonu:0.099 gr DTNB alınıp hacim metanolle 25 mL'ye tamamlandı.

-TCA: % 10'luk TCA çözeltisi hazırlandı.

Her numune için bir kontrol bir de örnek tüpü hazırlandı. Tüplere 0.1 mL kan (0.5 mL süpernatant) numunesi konuldu. Tüplere 0.7 mL tampon I'den ilave edildi (0.3 mL dokuda). Sadece örnek tüplerine 0.1 mL CHPO konulup ardından örnek ve kontrol tüplerine 5'er sn aralıklarla 0.1 mL Red. GSH eklendi ve 37 °C'de 10 dakika bekletildi. Üzerlerine 5 sn aralıklarla 1 mL TCA solüsyonu eklendikten sonra 5 dakika beklenip 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra yeni tüplere süpernatantlardan 1mL aktarıldı. Bunların üzerine de 2 mL tampon II ilavesinden sonra 0.1 mL DTNB konarak oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve 412 nm'de su körüne karşı okundu.

Hesaplama= (E Kontrol- E Örnek) x Ekstinksiyon katsayısı/mg protein

Ekstinksiyon katsayısı: 0.76989

8) Dokuda MDA tayini:

Analizde kullanılan çözeltiler:

-Renk ayracı: % 10'luk TCA ile perklorik asitle hazırlanan TBA iyice karıştırılır.

-Homojenat Tamponu: 0,2 mM, pH 7.4 olan, 150 mL Tris-HCl.

Deneyin Yapılışı:

Tablo 3. 1. Dokuda MDA tayini

Dokuda MDA Tayini		
Çözelti/Numune	Test	Kör
FTS (fizyolojik tuzlu su)	--	250µL
Numune	250µL	--
Renk ayracı	2250µL	2250µL
Vortekslenir, 100 °C'de 20 dk beklenir.		
3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir.		
Süpernatant 532 nm'de okunur.		

Tiyobarbitirik asit tepkimesi kullanılarak lipid içerik, düşük pH'da TBA varlığında ısıtılarak 532 nm'de en yüksek pik oluşturan stabil kırmızı-pembe renk elde edildi. Bu rengi bir MDA molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojen verdi. MDA'nin bir kısmı peroksidasyon sırasında oluşurken, büyük çoğunlukta, ortam asitleştirildikten sonra uygulanan ısıtma aşamasında lipid peroksidlerin yakılması sonucu oluştu. Sonuçlar 1.1.3.3 tetraethoxypropane'dan 10 µL alınarak 10 mL absolut etanolde çözdürülüp +4°C'de koyu bir şişede saklanan standarttan standart kalibrasyon eğrisi oluşturularak hesaplandı ve nmol/g olarak değerlendirildi.¹²⁰

9) Dokuda CAT tayini:

Katalaz tayininde H₂O₂ ile plazmanın inkübe edilmesinden sonra ortamda kalan hidrojen peroksitin amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturması ve bunun spektrofotometrik ölçümü temeline dayanan bir metod kullanıldı.¹¹⁴

Fosfat tamponu ile 20 kez dilue edilmiş dokunun 0.2 mL'si, 1 mL substrat (60 µmol/L, pH: 7.4 sodyum potasyum fosfat tamponu içinde 65 mmol/mL H₂O₂) ile 37 °C'de 60 sn inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon 1 mL amonyum molibdat (32.4mmol/L) eklenerek durduruldu ve hidrojen peroksidin molibdatla oluşturduğu sarı renkli kompleksin absorbansı 405 nm'de köre karşı spektrofotometrede ölçülerek A numune'nin absorbans değeri elde edildi. A kör1'in absorbans değeri 1 mL substrat, 1 mL molibdat ve 0.2 mL süpernatant ilave edilmesi sonucu elde edilerek aşağıdaki formüle göre sonuçlar hesaplandı.

$$\text{Katalaz aktivite hesabı (kU/g)} = ((A \text{ kör1} - A \text{ numune}) / (A \text{ kör2} - A \text{ kör3})) \times 271$$

10) Dokuda GSH tayini

GSH'ın doku ekstraksiyonu ve analizi için 0.5 g doku tartıldı. Doku üzerine 5 mL % 5'lik sülfosalisilik asit (SSA) çözeltisi eklenerek dokular cam bagetle ezildi ve vortekste iyice karıştırılarak homojenize edildi. Homojenat 4500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant içeriğinin 1 mL'sine 5 mL fosfat tamponu eklenerek 60 °C'de 10 dakika bekletildi. Bu solüsyon çabucak oda ısısına getirildi ve 1 mL DTNB ayırıcı ilave edilerek 412 nm'de ayraç körüne karşı optik dansitesi okundu. Glutatyon hesaplaması (µmol GSH/g doku), glutatyon standardı (% 5 sülfosalisilik asit) ile elde edilen kalibrasyon eğrisinden hesaplandı.^{121,122}

$$\text{Hesaplama (mmol/g)} = ((OD_{\text{numune}} - OD_{\text{kör}}) \times \text{Ekstinksiyon kat sayısı} - OD_{\text{std}}) \times f$$

f: Sulandırma katsayısı

3.2.4. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan *Gastrocnemius* dokuları % 10'luk formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildikten sonra, yıkanarak rutin doku takibi 70°, 80°, 90°, 96°, 100° alkol ve ksilolden geçirildikten sonra parafin bloklar yapıldı. Her bloktan 4 µm kalınlığında mikrotom ile kesitler alınıp preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanarak Leica DM 1000 ışık mikroskopunun x40 objektifi ile değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen bulguların skorlaması -: yok, +: hafif, ++: orta, +++: şiddetli olarak Tablo 4.3'te gösterildi.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

Kontrol, İskemi/reperfüzyon, Aposinin ve Aposinin+İskemi/reperfüzyon grupları arasındaki farklılığın önemi için SPSS 22.0 paket programı kullanılarak varyans analizi Anova testi yapıldı. Çoklu karşılaştırma için de Tukey testi yapıldı.

4.BULGULAR

4.1.Biyokimyasal Bulgular

4.1.1.Kan plazmasına ait biyokimyasal analizlerin sonuçları

Kontrol grubuna göre İ/R grubunda plazma MDA, AOPP ve İMA düzeylerinde artış tespit edilirken, İ/R grubuna göre AP+İ/R grubunda bu parametrelerde azalmanın olduğu belirlendi ($p<0.001$).

İ/R grubunda tüm gruplara göre plazma GSH düzeyi, GPx, CAT ve SOD aktivitelerinde bir azalma saptanırken, kontrol grubuna göre İ/R grubunda azalma saptanırken, İ/R grubuna göre AP+İ/R grubunda bu parametrelerde $p<0.001$ düzeyinde önem bulunarak Tablo 4.1’de gösterildi.

Tablo 4. 1. Tüm grupların plazmasında ölçülen bazı biyokimyasal parametreler

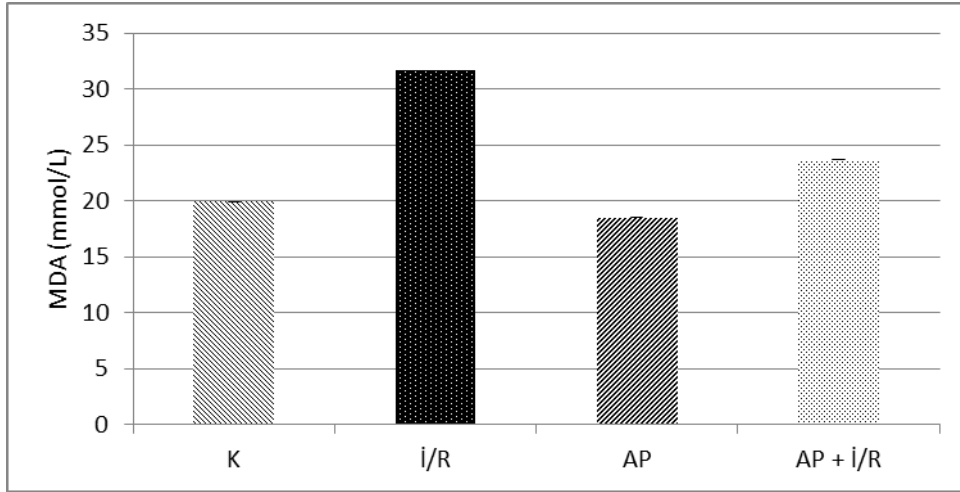
Gruplar	MDA (mmol/L)	SOD (EU/mL protein)	CAT (kU/L)
K	19.92 ± 0.21^c	16.26 ± 0.40^a	152.96 ± 2.07^b
İ/R	31.67 ± 0.69^a	13.16 ± 0.23^b	130.33 ± 1.07^d
AP	18.46 ± 0.31^c	17.16 ± 0.31^a	166.98 ± 1.57^a
AP+İ/R	23.64 ± 0.74^b	16.17 ± 0.12^a	133.95 ± 1.97^c
P	***	***	***

*** $p<0.001$. ^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harf ile gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir.

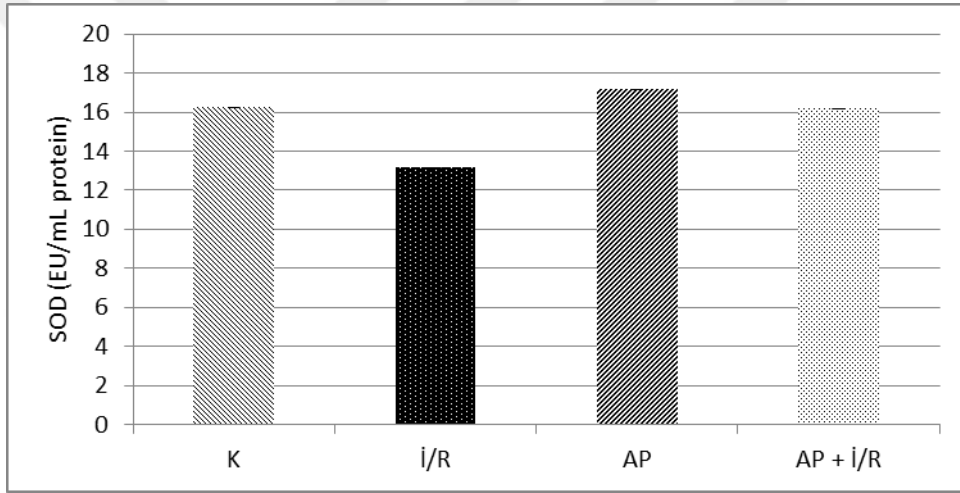
Gruplar	GSH (mmol/L)	GPx (U/mL protein)	AOPP (μ mol/L)	İMA (Δ ABSU.un)
K	2.51 ± 0.03^b	0.27 ± 0.00^a	0.004 ± 0.00^b	0.34 ± 0.01^b
İ/R	2.05 ± 0.01^d	0.23 ± 0.00^b	0.006 ± 0.00^a	0.70 ± 0.01^a
AP	2.68 ± 0.03^a	0.27 ± 0.00^a	0.003 ± 0.00^b	0.33 ± 0.01^b
AP+İ/R	2.21 ± 0.02^c	0.26 ± 0.00^a	0.004 ± 0.00^b	0.35 ± 0.01^b
P	***	***	***	***

*** $p<0.001$. ^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harf ile gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir.

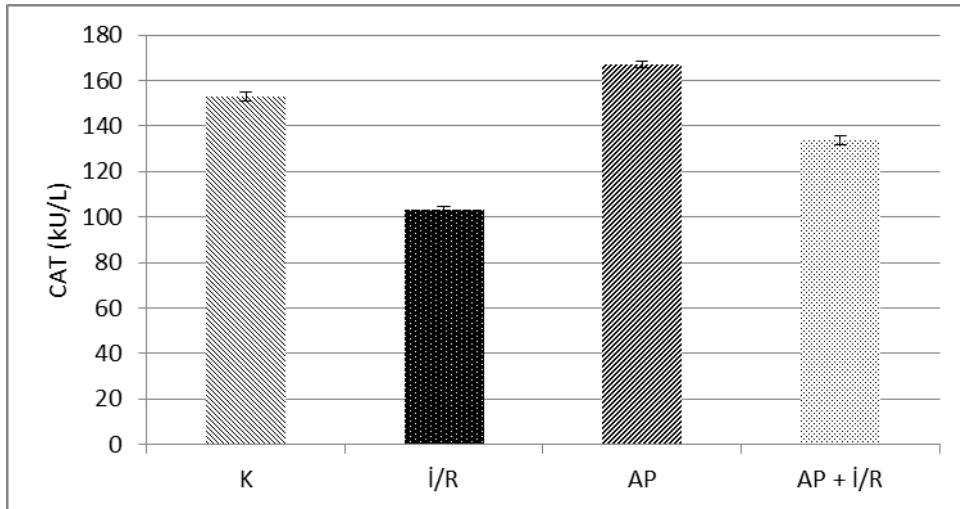
Tablo 4.1’de verilerin tüm parametreler Şekil 4.1-7’de grafiksel olarak gösterildi.



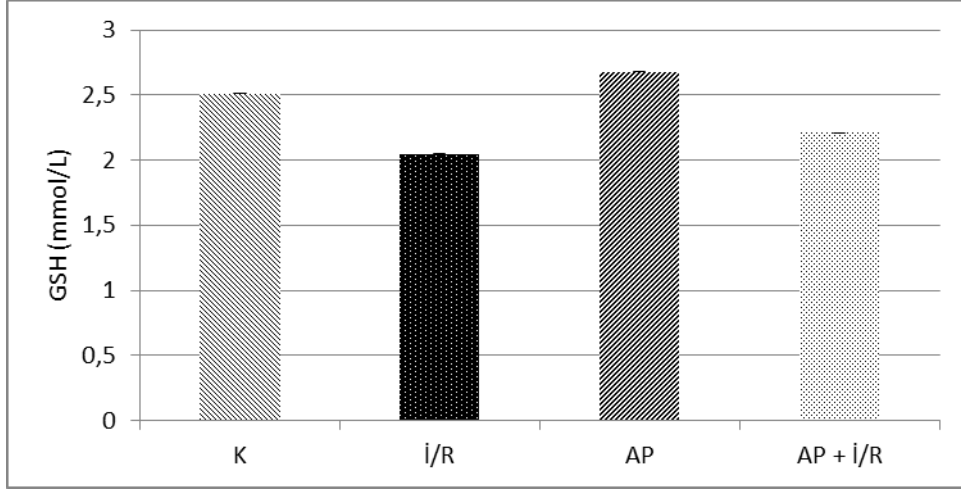
Şekil 4. 1. Plazma MDA düzeyinin gruplara göre dağılımı



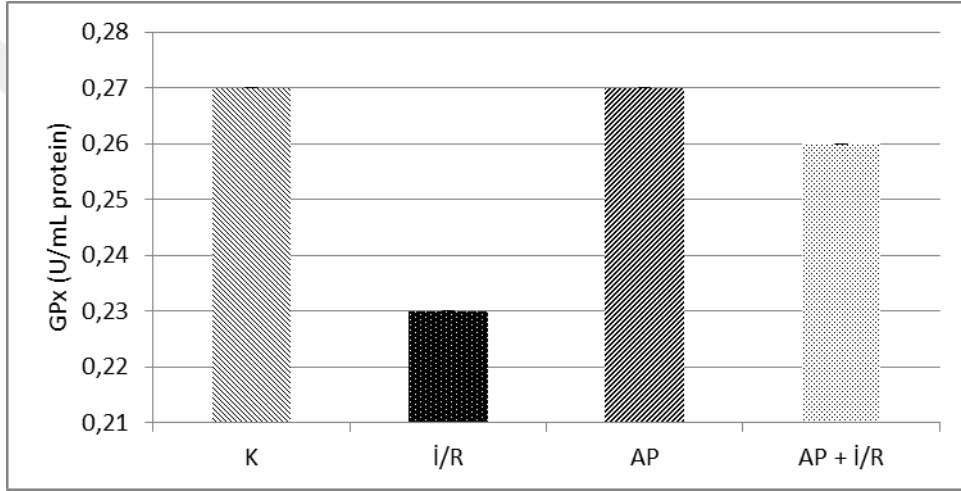
Şekil 4. 2. Plazma SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı



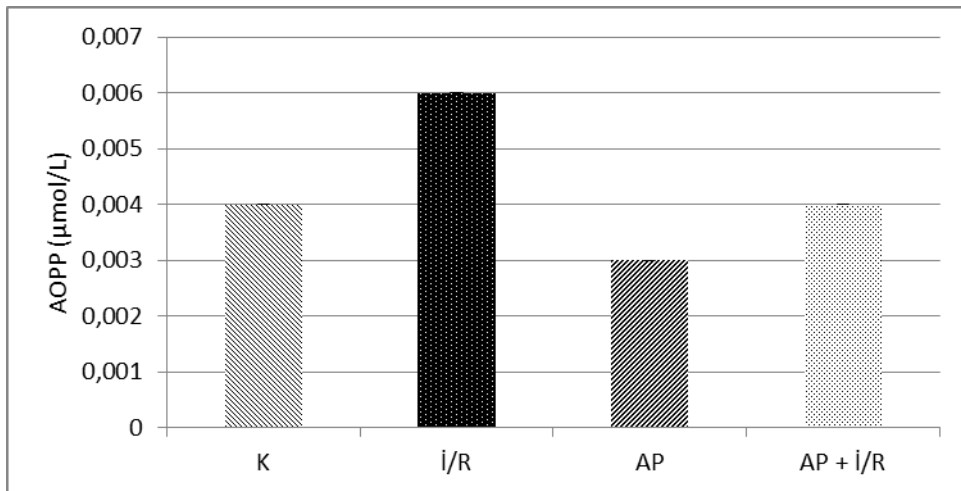
Şekil 4. 3. Plazma CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı



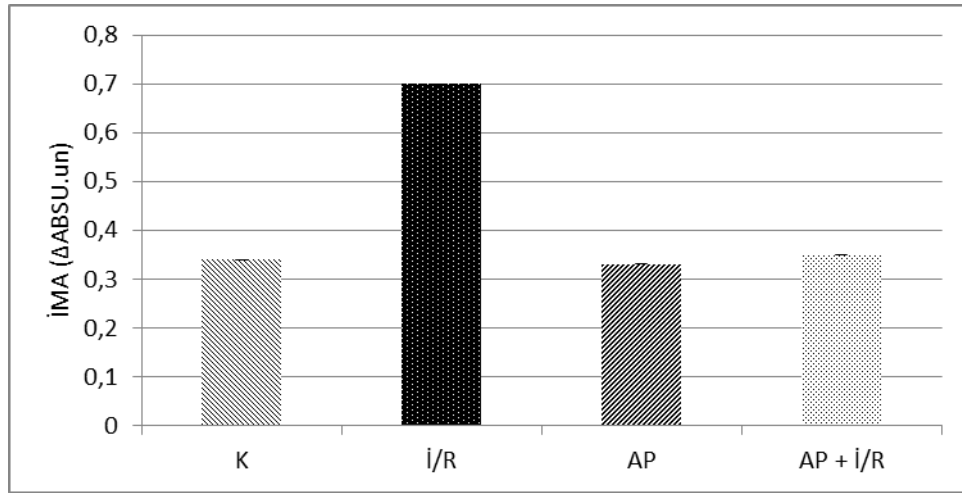
Şekil 4. 4. Plazma GSH düzeyinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. 5. Plazma GPx aktivitesinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. 6. Plazma AOPP düzeyinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. 7. Plazma İMA düzeyinin gruplara göre dağılımı

4.1.2. *Gastrocnemius* dokusuna ait biyokimyasal analizlerin sonuçları

İ/R grubunda tüm gruplara göre *Gastrocnemius* dokusu MDA, düzeyinde artış tespit edilirken, AP+İ/R grubunda MDA düzeyinde İ/R grubuna göre azalmanın olduğu belirlendi ($p<0.001$).

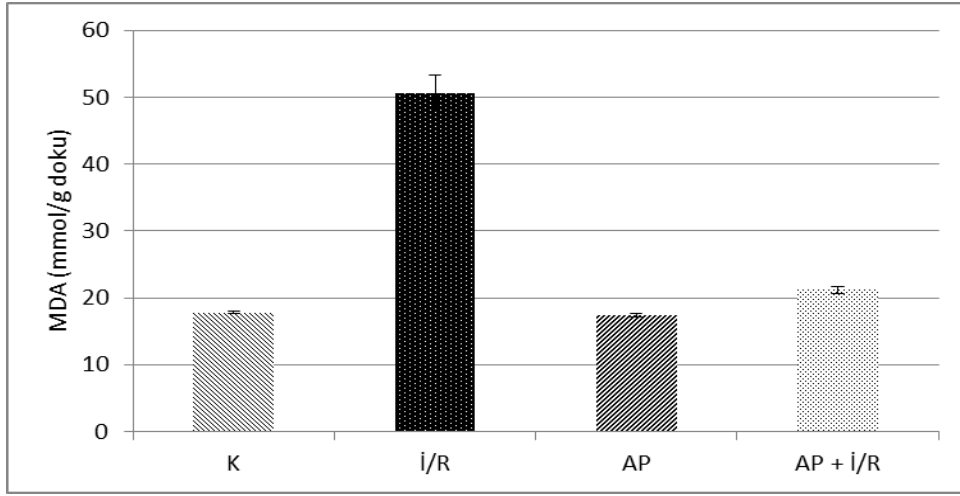
İ/R grubunda tüm gruplara göre *Gastrocnemius* dokusunda GSH düzeyi, GPx, CAT ve SOD aktivitelerinde bir azalma saptandı. İ/R grubuna göre AP+İ/R grubunda bu değerlerde $p<0.001$ önem derecesinde artış tespit edilerek Tablo 4.2’de gösterildi.

Tablo 4.2. Kontrol ve diğer grupların *Gastrocnemius* dokusundaki bazı biyokimyasal parametreler

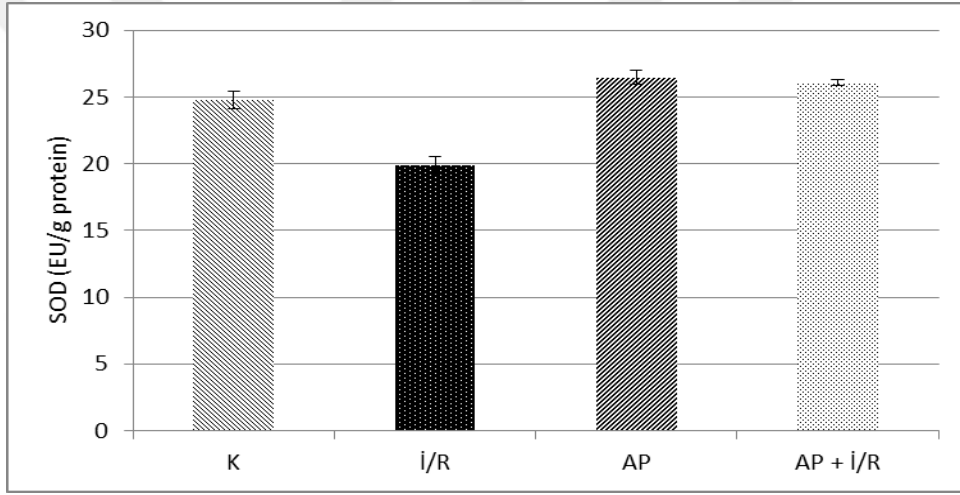
Gruplar	MDA (mmol/g doku)	SOD (EU/g protein)	CAT (kU/g doku)	GSH (mmol/g doku)	GPx (U/g protein)
K	17.80 ± 0.18 ^b	24.76 ± 0.64 ^a	253.22 ± 5.78 ^a	2.14 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.00 ^a
İ/R	50.60 ± 2.65 ^a	19.89 ± 0.64 ^b	155.14 ± 7.96 ^c	2.06 ± 0.02 ^b	0.13 ± 0.01 ^b
AP	17.40 ± 0.30 ^b	26.45 ± 0.54 ^a	264.70 ± 3.94 ^a	2.16 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.00 ^a
AP+İ/R	21.18 ± 0.49 ^b	26.09 ± 0.25 ^a	191.12 ± 1.23 ^b	2.13 ± 0.00 ^a	0.16 ± 0.00 ^a
P	***	***	***	***	***

*** $p<0.001$. ^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harf ile gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir.

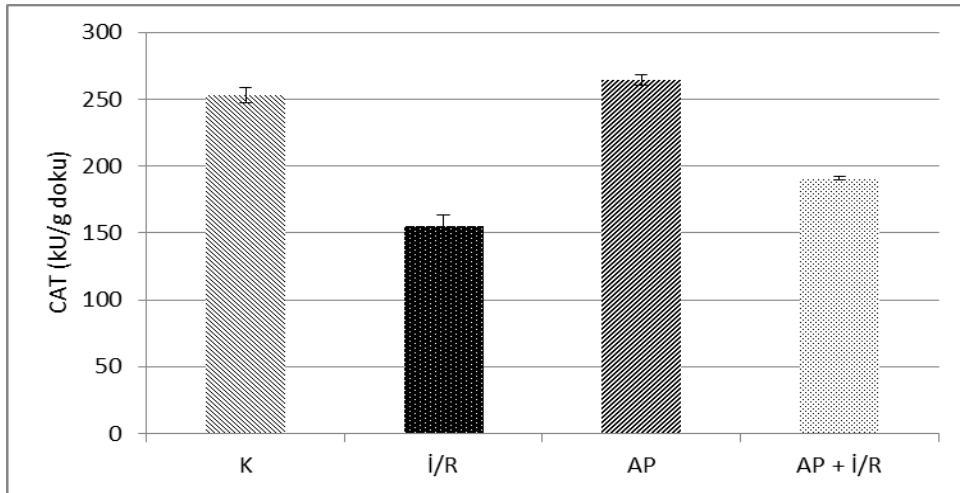
Tablo 4.2’de verilerin tüm parametreler Şekil 4.8-12’de grafiksel olarak gösterildi.



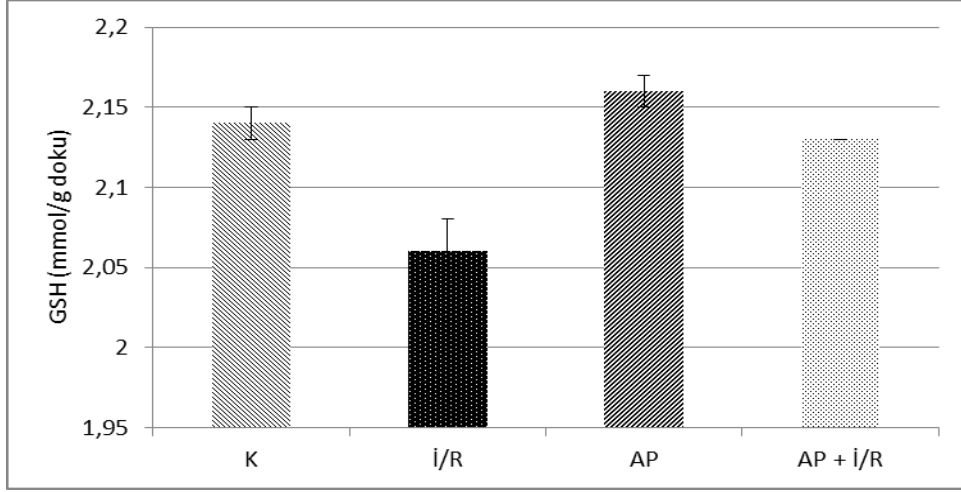
Şekil 4. 8. *Gastrocnemius* dokusundaki MDA düzeyinin gruplara göre dağılımı



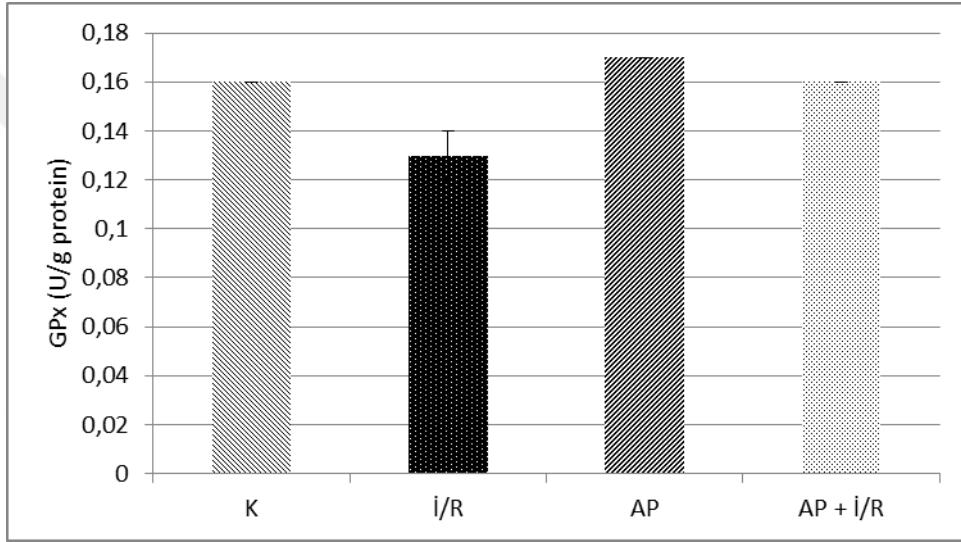
Şekil 4. 9. *Gastrocnemius* dokusundaki SOD aktivitesinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. 10. *Gastrocnemius* dokusundaki CAT aktivitesinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. 11. *Gastrocnemius* dokusundaki GSH düzeyinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. 12. *Gastrocnemius* dokusundaki GPx aktivitesinin gruplara göre dağılımı

4.2.Histopatolojik Bulgular

4.2.1.Makroskopik bulgular

Gluteal kas dokuları makroskopik olarak incelendiğinde, K ve AP gruplarında normal görünümde olduğu gözlenirken (Şekil 4.13 ve Şekil 4.15), I/R grubunda kas dokularının şiddetli düzeyde ödemli, ıslak ve koyu kahve-kırmızı renkte görüldüğü, konjesyon ve yer yer hemorajiler gözlemlendi (Şekil 4.14). AP+I/R grubunda ise çok hafif ödem ve konjesyon gözlemlendi (Şekil 4.16) .



Şekil 4. 13. Kontrol grubu gluteal kas dokusunun normal görünümü.



Şekil 4. 14. İ/R grubu gluteal kas dokusunda konjesyon, ödem ve hemoraji.

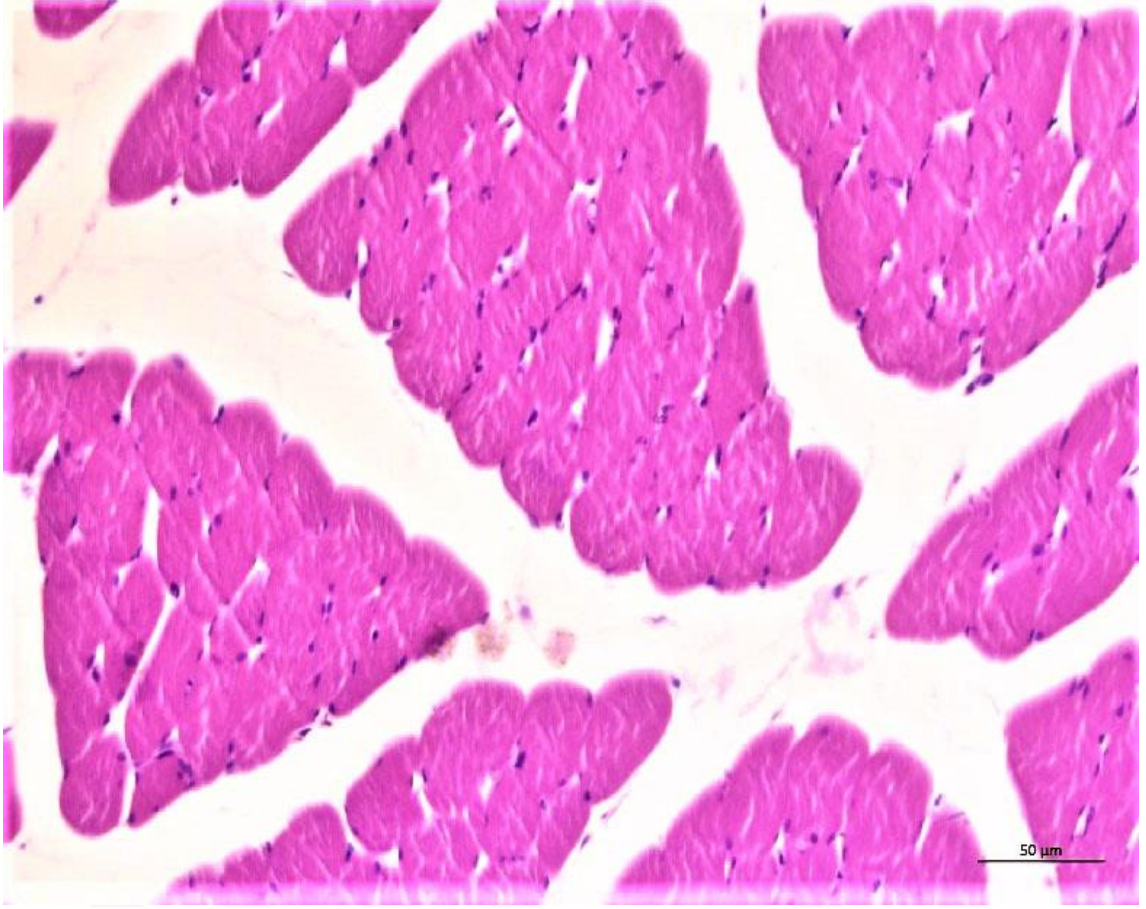


Şekil 4. 15. Aposinin grubu gluteal kas dokusunun normal görünümü.



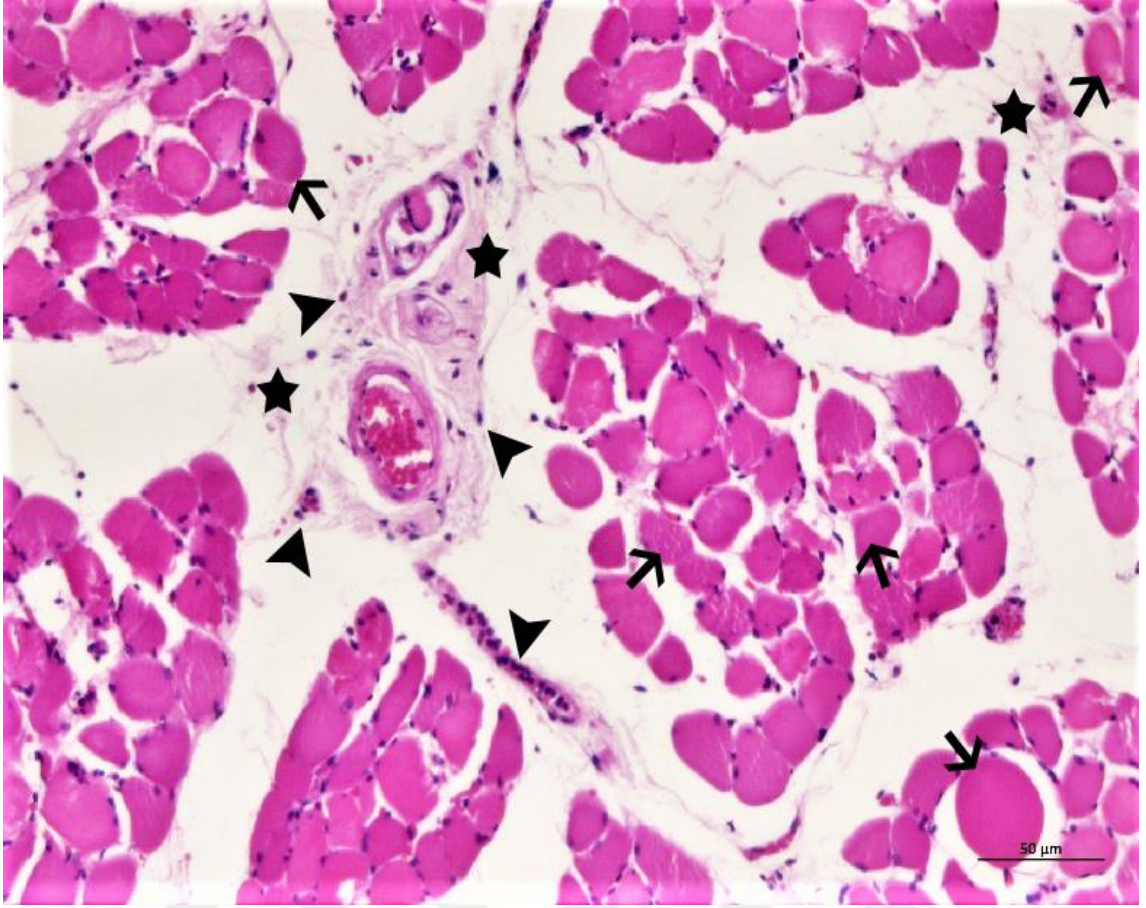
Şekil 4. 16. AP+İ/R grubu gluteal kas dokusunda hafif ödem.

4.2.1. Mikroskopik Bulgular



Şekil 4. 17. Kontrol grubu rat *Gastrocnemius* normal histopatolojik görüntüsü H&E, Bar: 50µm

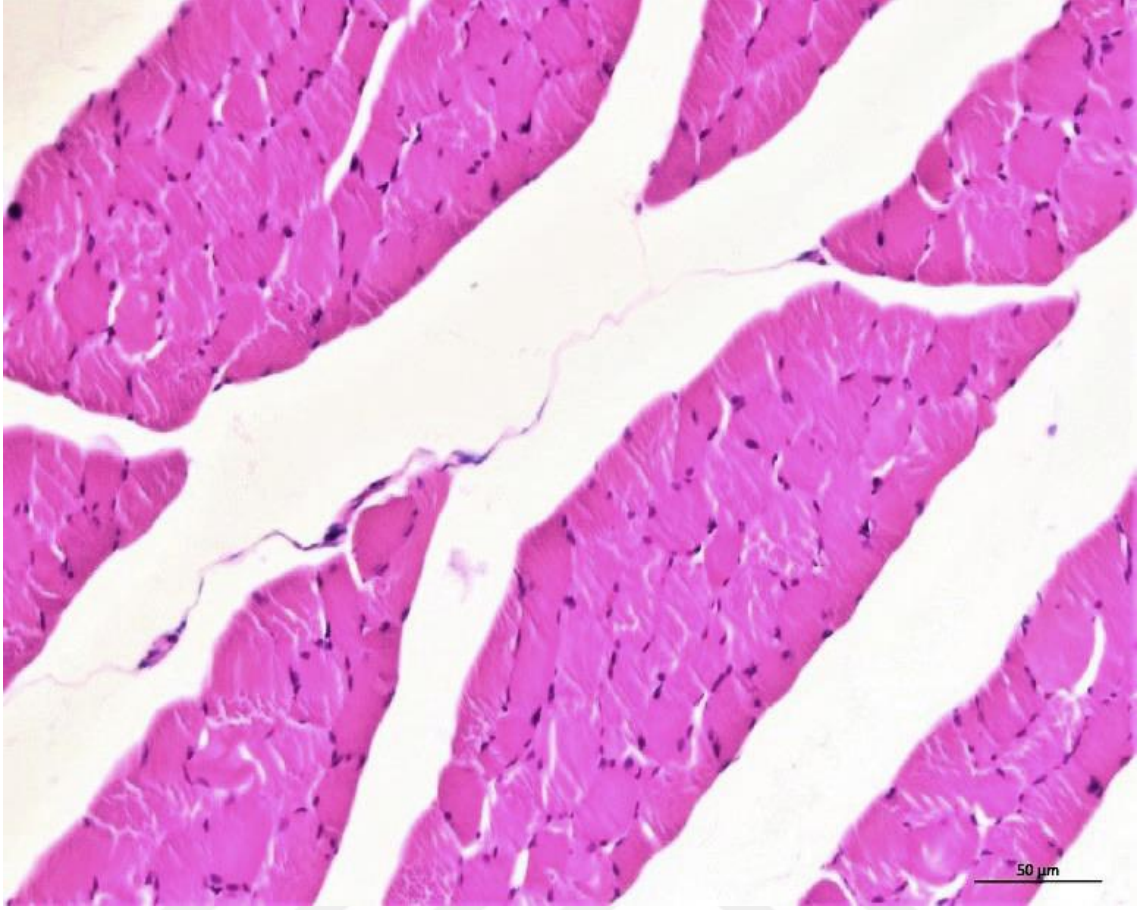
Kontrol Grubu: Bu grupta bulunan ratların *Gastrocinemius* dokuları incelendiğinde normal histolojik yapıda olduğu görüldü (Şekil 4.17).



Şekil 4. 18. İ/R grubu rat *Gastrocnemius* histopatolojik görüntüsü H&E, Bar: 50μm

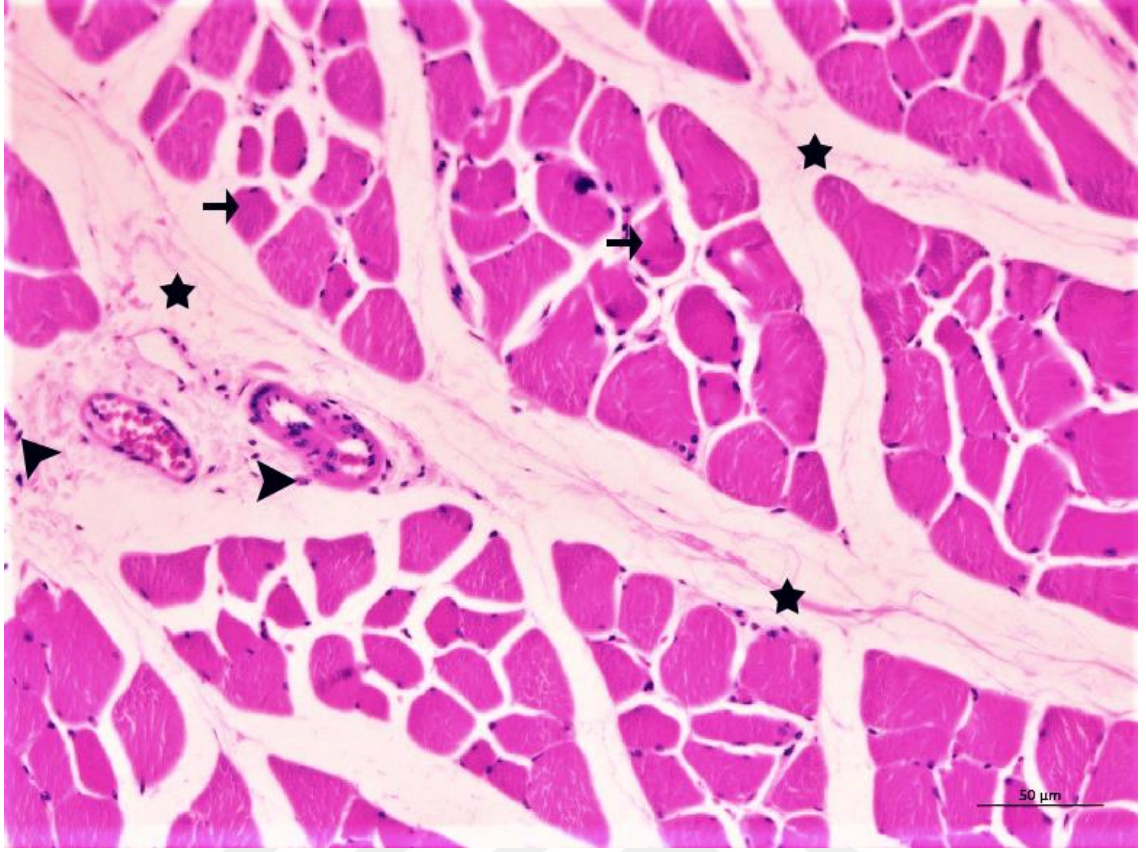
İ/R grup, Gastrocnemius dokusu, kas liflerinde striasyonun kaybı, kasliflerinde hiyalin dejenerasyonu ve zenker nekrozu (oklar). İnterlobüler aralıklarda şiddetli ödem (yıldızlar) ile birlikte mononükleer hücre infiltrasyonları (ok başları). İntersitisyel damarlarda şiddetli dilatasyon ve konjesyon, H&E, Bar: 50μm.

İskemi/Reperfüzyon Grubu: Bu grupta bulunan ratların gluteal kas dokuları incelendiğinde, bazı kas liflerinde striasyonun kaybolduğu, kasliflerinde hiyalin dejenerasyonu ve zenker nekrozu gözlendi. İnterlobüler aralıklarda şiddetli ödem ile birlikte mononükleer hücre infiltrasyonları ve hemoraji tespit edildi. İntersitisyel damarlarda şiddetli dilatasyona ve konjesyona rastlanıldı (Şekil 4.18).



Şekil 4. 19. AP grubu rat *Gastrocnemius* histopatolojik görüntüsü H&E, Bar: 50μm

Aposinin Grubu: Aposinin grubunda bulunan ratların kas liflerinin yapısı normal olup çekirdekleri perifere yerleşim göstermiştir. Kas lifleri bütün ve striasyonları (çizgilenme) belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.19).



Şekil 4. 20. AP+İ/R grubu rat *Gastrocnemius* histopatolojik görüntüsü H&E, Bar: 50μm
Aposinin + İ/R grup, *Gastrocnemius* dokusu, interstisyel damarlarda hafif düzeyde konjesyon, hafif düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (ok başları), kas liflerinde striasyonun kaybı ve hafif düzeyde ödem (yıldız), H&E, Bar: 50μm.

Aposinin+İskemi/Reperfüzyon Grubu: Bu grupta bulunan ratların gluteal kas dokuları incelendiğinde kas liflerinde orta düzeyde hiyalin dejenerasyonlarına tespit edildi. Bazı kas liflerinde striasyonun kaybolduğu ve ödemin hafif düzeyde olduğu belirlendi. İnterstisyel damarlarda hafif düzeyde konjesyon gözlemlendi (Şekil 4.20). Histopatolojik bulgular Tablo 4.3'te gösterildi.

Tablo 4. 3. *Gastrocnemius* dokusuna ait histopatolojik bulguların skorlanması

	K	AP	İ/R	AP+İ/R
Kas liflerinde hiyalin dejenerasyonu	-	-	+++	++
Kas liflerinde zenker nekrozu	-	-	+++	-
İnterlobüler aralıklarda ödem	-	-	+++	+
İntersitisyel damarlarda şiddetli dilatasyon ve konjesyon	-	-	+++	++

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda; ratlarda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremitte iskemi-reperfüzyon hasarında Aposinin'in koruyucu ve tedavi edici etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Çalışma sonucunda Aposinin'in alt ekstremitte İ/R hasarında lipid peroksidasyonunu azalttığı, antioksidan enzim düzeylerini önemli oranda arttırdığı, oluşan oksidatif stresi önlediği, oluşan kas dokusu striasyon kaybını, hemorajiyi, konjesyonu, zenker nekrozunu, hiyalin dejenerasyonunu ve mononükleer hücre infiltrasyonunu azalttığı görüldü.

Alt ekstremitte iskemisi mortalite ve morbidite oranı yüksek olan klinik bir sorundur. Buna sebep olan nedenler ortadan kaldırılıp reperfüzyonun sağlanmasında bile bu riskler devam etmektedir. Alt ekstremitte İ/R hasarı (oksijen paradoksu olarakta bilinir) özellikle aort cerrahisinde, femoral arter tıkanıklıklarında ortaya çıkarak uzak organ hasarlarına neden olduğu için klinik olarak ciddi öneme sahiptir. Klinik olarak İ/R hasarının biyokimyasal mekanizmalarının açıklanması, hasarı azaltacak yeni tedavi yöntemlerinin ve ajanlarının geliştirilmesi gerekmektedir.

İskemi, vücuttaki hücre, doku ve organlara işlevleri için gerekli olan kan akımının herhangi bir nedene bağlı olarak reversible veya irreversible şekilde azalması veya tamamen kesilmesi sonucu perfüzyonunun bozulması olarak tanımlanır.^{3,20} İskeminin olduğu doku ve organlarda oksijene olan ihtiyaç giderilemediği için doku asitliğinde artış, fosfolipaz ve lizozimlerin aktivasyonu, toksik metabolitlerin birikmesi sonucu hücresel hasarlar ve nekrozlar meydana gelmektedir.

İskemi sonrasında dokuya kan akımının tekrar sağlanması ise reperfüzyon olarak adlandırılır. İskeminin oluşturduğu hasarın daha da genişlemesine iskemi/reperfüzyon hasarı denir. İskemi-reperfüzyon kaynaklı yaralanma, akut organ işlev bozukluğunun birincil nedenidir ve genellikle koroner arter hastalığı, trombolitik tedavi, balon

anjyoplasti, kardiyopulmoner bypass, tıkalıcı arter hastalığı (aort ve periferik arteriyel çapraz kenetleme), felç, turnike uygulaması, miyoküler doku transferi, sepsis, şok, açık renal taş cerrahisi, parsiyel nefrektomi, travma, geniş alan yanıkları ve böbrek nakli gibi birçok durumda ortaya çıkar.¹²³⁻¹²⁷

İskeminin dokuda meydana getirdiği hasar, dokular arasındaki hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılıyken, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, diferansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre ise farklılık gösterir. İskemiye karşı kemik ve deri gibi dokular dirençliyken, iskelet kası ve bağırsak mukozası gibi dokular daha hassastır. Bu dokulardaki iskemik hasara karşı meydana gelebilecek değişikliklerin geri dönüşüm süreleri kas dokusu için 4 saat, sinir dokusu 8 saat, yağ dokusu 13 saat, deri için 24 saat ve kemik dokusu için ise 4 güne kadardır.¹²⁸

İskemik hasarlarda en hassas doku iskelet kası olması sebebiyle alt ekstremitelerde iskemi/reperfüzyon hasarında iskelet kası önemli rol oynamaktadır. Meydana gelen reperfüzyon, dokudaki inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü hasar ile doğru orantılıyken nekrotik kas miktarıyla ters orantılıdır. Kas dokusunda oluşan iskemik hasar iskemi sonrası 2 saate kadar olan kısımda geri dönüşüm sağlanabilirken üçüncü saatte ciddi kas hasarı ve altıncı saatte yaklaşık olarak % 97 oranında dokuda fonksiyonel kaybın meydana geldiği bildirilmiştir.^{1,7,30}

Aposinin (4'-hidroksi-3'-metoksi-asetofenon) asetovanillon olarak da bilinen 166.17 g/mol moleküler ağırlığa, düşük toksisite ve özgüllüğe sahip bir asetofenondur. Aposinin, seçici bir nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz enzimi inhibitörü ve ROS üretimini önleyici olarak görev yapan hücre içi aktif bir doğal antioksidan ve antienflamatuvar özelliklerinden dolayı kardiyovasküler hastalıklarda, astımda, artrit, ve nörolojik hastalıklarda (Beyin travması, Alzheimer ve Parkinson hastalığı) tedavi amacıyla kullanılmaktadır.^{11-17,129} Aposinin'in yapılan çalışmalar

sonucunda İ/R hasarına karşı dokuları koruduğu belirlenmiştir.^{13,130,131} Aposinin araşidonik asit metabolizmasını etkilediği¹³², kan akışını arttırdığı¹³³ ve siklooksijenaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir.¹³⁴

Oksidatif stres, hücrel metabolizma sırasında meydana gelen hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin miktarlarındaki artışı (ROS) ile onları detoksifiye eden, antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır. Oksidatif stresteki artış sonucunda oluşan reaktif oksijen türleri hücre içi lipid ve protein yapıların çift bağ içeren gruplarına ve DNA'daki bazların çift bağlarına saldırır ve bir hidrojen atomu kopararak zincirleme oksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar bununla birlikte hücre içi lipid, protein ve DNA gibi makromoleküller hasarlanarak hücre zedelenmesi veya hücre ölümüne neden olmaktadır.¹³⁵ Oksidatif stresi ve enflamatuar tepkileri hafifleten birçok ilaç, İ/R deney modellerinde organ hasarını hafifletmek için kullanılmıştır.¹³⁶⁻¹³⁸

NADPH oksidaz, ROS'un ana kaynağıdır ve NADPH oksidazın yüksek aktivitesi, ROS üretiminin artmasına neden olur.¹³⁹ Xu M ve ark.¹⁸ yaptığı çalışmada, NADPH oksidaz inhibitörü Aposinin'in, oksidatif stresi baskılayarak ROS üretimini ve hücre ölümünü önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir.

Poliansaüre yağ asitlerinin peroksidasyonu (lipid peroksidasyonu) sonucu son ürün olarak oldukça toksik bir aldehid olan MDA oluşur. Meydana gelen bu dokulardaki lipid peroksidasyonu ile hızlı bir şekilde hücre ölümleri başlamaktadır.¹⁴⁰ Lipid peroksidasyon sonucuna bağlı MDA artışı, serbest oksijen radikalleri, hücre zarı fosfolipitlerinin peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı bütünlüğünde bozulma, hücre şişmesi ve araşidonik asit/lipid peroksit salınımı meydana getirirler.

Yapılan birçok iskemi çalışmasında İ/R oluşturulan grubun kan ve dokularındaki MDA düzeyinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği saptanmıştır.¹⁴¹⁻¹⁴⁵ Chang ve

ark.¹⁴⁶⁻¹⁵⁵ ve Li ve ark.¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. Kalp kası İ/R hasarında¹⁴⁶, böbrek İ/R hasarında^{155 156}, testis İ/R hasarında,¹⁵⁴ karaciğer İ/R hasarında¹⁴¹, omurilik İ/R hasarında^{145,150-152} AP uygulanan gruptaki MDA düzeyinin İ/R grubuna göre önemli oranda azaldığı saptanmıştır.

Alt ekstremitte İ/R hasarı uygulanan çalışmalarda *Gastrocnemius* kas dokusu ve kan MDA düzeyinin kontrol grubuna göre İ/R grubunda önemli oranda azaldığı bulunmuştur.^{142,147,153,158,159} Alt ekstremitte İ/R hasarı üzerine Aposinin'in etkisi üzerine yapılan çalışmalarda kontrol grubuna göre İ/R grubunda MDA düzeyi artarken İ/R grubuna göre Aposinin'in uygulandığı grupta MDA düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir.^{142,157,160} Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular doğrultusunda Aposinin'in alt ekstremitte İ/R hasarında lipid peroksidasyonunu önlediği saptandı.

SOD ve CAT, organizmaların savunma mekanizmasında yer alan antioksidan enzimlerdir. SOD, süperoksitin antioksidan savunmanın ilk basamağı olan H₂O₂ ve O₂'ye dönüşümünü katalizlerken, CAT, H₂O₂'yi O₂ ve H₂O'ya dönüştürür.¹⁶¹ SOD, serbest radikalleri nötralize edebilen ve dokuları serbest radikallerin ve diğer aktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden koruyabilen endojen antioksidan ve serbest radikallerin ortamdaki temizlenme kapasitesini gösteren bir enzimdir.^{162,163}

Alt ekstremitte İ/R hasarı uygulanan çalışmalarda *Gastrocnemius* kas dokusu ve kan SOD ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre İ/R grubunda önemli oranda azaldığı bulunmuştur.^{142,147,153,158,159} Kalp kası İ/R hasarında,¹⁴⁶ böbrek İ/R hasarında,^{155,156} karaciğer İ/R hasarında,¹⁴¹ omurilik İ/R hasarında^{145,150,151} SOD düzeyinin İ/R grubunda kontrol grubuna göre önemli oranda azaldığını, bağırsak iskemisinde¹⁴⁸ ve omurilik İ/R hasarında omurilik SOD ve CAT aktivitesinin¹⁵² İ/R grubunda kontrol grubuna göre önemli oranda azaldığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada *Gastrocnemius* kas dokusu ve plazma SOD ve CAT düzeylerinin İ/R

grubunda diğer gruplara göre azalmanın $p<0.001$ öneminde olduğu literatür bulguları ile paralellik göstermektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda AP'in alt ekstremitte İ/R hasarında kas ve kan SOD ve CAT aktiviteleri ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanılmamıştır. Bu bulgular doğrultusunda AP'in antioksidan özelliğinden dolayı SOD ve CAT aktivitelerini arttırdığı ve oksidatif stresi önlediği görüldü.

Glutasyon (L- γ -glutamil-L-sisteinilglisin) (GSH); yapısında bir tiyol taşıyan, glutamik asit, sistein ve glisin'den meydana gelen bir tripeptittir.¹⁶⁴ GPx ise, H_2O_2 ve çeşitli hidro peroksitleri ve lipid peroksitleri ayrıştıran selenyum (Se) bağımlı bir enzimdir. GPx hücrel bir enzimde stoplazma boyunca dağılmış vaziyette bulunur ancak mitokondride aktivite gösterir.¹⁶⁴ Hücre döngüsü içindeki birçok özelliğine ek olarak, GSH ve GPx, hücrenin koruyucu mekanizmasının lipid peroksidasyonuna ve İ/R hasarı sırasında ortaya çıkan oksidatif strese karşı koruyan önemli bileşenlerdir.^{165,166}

Glutasyon, peroksitlerin parçalanması, nitrik asit döngüsünün düzenlenmesi, protein disülfür bağlarının bakımı, DNA sentezi ve onarımı ile ilgilidir. Oksidatif streste rolüne ek olarak, glutasyon ayrıca C ve E vitaminleri gibi ekzojen antioksidanların korunmasına da yardımcı olur. Hücreler içinde, glutasyon redükte ve okside halde bulunur. Sağlıklı hücrelerde, toplam glutasyon havuzunun % 90'ından fazlası indirgenmiş halde iken % 10'dan azı oksitlenmiş veya disülfür formunda bulunur. GSSG'nin GSH'ye oranının artması oksidatif stresin bir göstergesidir.¹⁶⁷

Gastrocnemius kası İ/R çalışmalarında kas dokusu ve plazmada GSH düzeyinin kontrol grubuna göre İ/R grubunda azaldığı,^{145,147,152,153,168} omurilik İ/R hasarında omurilik GSH düzeyi,¹⁵¹ kas dokusu ve plazmadaki GSH düzeyi ve GPx aktivitesinin^{142,158,159} kontrol grubuna göre İ/R grubunda azaldığı bildirilmiştir.

Duran ve ark.¹⁵⁷ rat alt ekstremitte İ/R hasarı üzerine AP'nin etkisi üzerine yaptıkları çalışmada GSH düzeyini İ/R grubuna göre AP'nin azalttığı bulgusu yapılan

çalışmayla benzerdir. Liu ve ark.¹⁴¹ yaptığı İ/R hasarında sıçan karaciğer dokusundaki GSH düzeyinin İ/R- grubunda artarken İ/R grubuna göre AP+İ/R grubunda arttığı saptanmıştır. Bir antioksidan olan AP'nin GSH düzeyini ve GPx aktivitesini arttırdığı, iskemi durumlarında kaslardaki hasarı azalttığı yapılan çalışma ile tespit edilmiştir.

İskemi modifiye albümin, iskemik hasar ve oksidatif stresin belirlenmesinde son yıllarda biyo belirteç olarak kullanılan hassas bir parametredir. Akut iskemik durumlarda bakır, nikel ve kobalt gibi transizyonel metaller için albuminin metal bağlama kapasitesi azalır ve ortaya çıkan bu yeni albumin İMA olarak tanımlanır^{169,170} İMA'nın gösterilmesi myokard iskemisi sırasında insan serum albumininin N terminal bölgesinin kobalta bağlanmasında azalma olduğunun tespitine dayanmaktadır.^{171,172} Albuminin N terminal bölgesi kobalt, bakır, nikel gibi ağır metallerin bağlanma yeridir. İskemi veya reperfüzyon esnasındaki sodyum-kalsiyum pompasının bozulması gibi hücrel değişimler sonucu serbest radikallerin ve laktik asidozun artması gibi nedenlerle albuminin N terminal bölgesinin bozulmasına neden olarak albuminin metal bağlama kapasitesi azalır.^{172,173} Yapılan çalışmalarda iskemi modifiye albumin düzeyi iskemik kasta, akut koroner sendrom, ileri düzey karaciğer yetmezliği, böbrek yetmezliği, kanserin ileri evrelerinde, akut inmelere ve gebelikte yükseldiği tespit edilmiştir.^{174,175}

Albüminin kobalt için bağlanma kapasitesini değiştiren modifikasyonlar, asidoz, azalan oksijen gerilimi ve serbest radikallerin meydana gelmesi sonucunda iskemi reperfüzyon da ortaya çıkabilir. Son araştırmalar, çeşitli koşulların pulmoner emboli, mezenterik iskemi, periferik arter tıkanıklığı, derin venöz tromboz ve felç dâhil olmak üzere iskemi tarafından modifiye edilmiş albümin seviyelerini yükseltebileceğini ve iskemi tarafından modifiye edilmiş albüminin bu durumlar için tanınan bir biyolojik belirteç olabileceğini bildirmiştir.^{169,176-178}

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri ya da oksidatif stres ürünleriyle kovalent modifikasyonu ile AOPP meydana gelir.¹⁷⁹ Proteinler oksidanlar ile etkileşime girdiklerinde kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları protein molekülleri üzerine serbest radikallerin direkt etkileri sonucunda oluşabilmektedir. Bir kısmı ise proteinlere oksidasyon yan ürünlerinin kovalent olarak bağlanmasıyla meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı yıkımı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipit ve şekerlerin oto-oksidasyonu ile başlatılabilmekte ve bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinler de dahil olmak üzere diğer hücrel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artmasına neden olur.^{179,180}

Çakmak ve ark.¹⁸¹ insanda akut iskemik felçlerde serum İMA düzeyinin kontrol grubuna göre artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Wu ve ark.¹⁴⁹ yaptıkları böbrek İ/R çalışmasında böbrek dokusu ve serum AOPP düzeyinin diğer gruplara göre İ/R grubunda arttığını bulmuşlardır. Omurilik İ/R hasarında omurilik dokusu ve plazma AOPP düzeyinin İ/R grubunda arttığına dair çalışmalar söz konusudur.^{145,152,175} Bağırsak iskemisinde Bahsir ve ark.¹⁴⁸ benzer bulguları tespit etmişlerdir.

Yıldırım ve ark.¹⁵⁸ ratlardaki *Gastrocnemius* kası İ/R çalışmalarında plazma İMA ve AOPP düzeylerinin kontrol grubuna göre İ/R grubunda arttığını bulmuşlardır. Gündüz ve ark.¹⁶⁹ yaptıkları ratlardaki alt ekstremité İ/R çalışmasında kas dokusu ve plazma İMA düzeyinin kontrol grubuna göre İ/R grubunda arttığını saptamışlardır. Ali Abdelgawad ve ark.¹⁸² kalp kası İ/R çalışmasında İMA düzeylerinin İ/R grubunda diğer gruplara göre arttığını bulmuşlardır¹⁸². Yapılan araştırmalar sonucunda AP'in alt ekstremité İ/R hasarında kas ve kan İMA ve AOPP düzeyleri ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmamıştır.

Yapılan bu tez çalışmasında histopatolojik olarak Özer ve ark.¹⁶⁰,ın yaptığı çalışma ile paralel sonuçlar elde edilmiş olup, deneysel olarak oluşturulan alt ekstremitte İ/R hasarında makroskopik olarak İ/R grubunun kas dokusunda oluşan ödem, konjesyon ve hemorajinin AP uygulamasıyla giderildiği, mikroskopik olarak ise İ/R grubunun *Gastrocinemius* dokusundaki çizgilerin kaybolduğu; şiddetli hemoraji, zenker nekrozu, hiyalin dejenerasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonunun AP uygulamasıyla bu bulguların hafıflediği tamamen kaybolmadığı görüldü.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Özellikle iskelet sistemi ve kaslarda meydana gelen travma sonucu ve bazı ameliyatlarda cerrahların işini kolaylaştırmak için ameliyat bölgesinde kansız bir ortam oluşturmak amacıyla turnike uygulaması alt ekstremité İ/R hasarına neden olmaktadır. Bu İ/R hasarından hastayı korumak amacıyla birçok antioksidan kullanılmaktadır.

Elde edilen biyokimyasal parametrelerin sonuçları ve histopatolojik bulgular doğrultusunda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremité İ/R modelinde Aposinin'in iskelet kası üzerine etkisini incelemek amacıyla yapılan bu çalışmada İ/R'nin kas hasarına neden olduğu, lipid peroksidasyonunu, oksidatif stresi arttırdığı ve antioksidan enzim düzeylerini önemli oranda azalttığı görülmektedir. İskemi oluşturulmadan önce uygulanan Aposinin'in kasları hasardan koruduğu, lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan enzim düzeylerini önemli oranda arttırdığı görülmektedir. Sonuç olarak ratlarda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremité iskemi-reperfüzyon hasarında Aposinin'in kaslarda oluşan hasarı azaltarak koruyucu etki gösterdiği saptandı.

KAYNAKLAR

1. Ege T. Kalp ve Damar Hastalıklarında İskemi/Reperfüzyon Hasarı. Duran E (Ed). *Kalp ve damar cerrahisi*. I. Baskı. İstanbul: Çapa Tıp Kitabevi, 2004: 197-215.
2. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*, 1995, 146: 3.
3. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004, 24: 468-475.
4. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008, 147: 153-159.
5. Yardim-Akaydin S, Sepici A, Özkan Y, Şimşek B, Sepici V. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 2006, 35: 61-64.
6. Dimakakos P, Kotsis T, Kondi-Pafiti A, Katsenis K. Oxygen free radicals in abdominal aortic surgery: an experimental study. *Journal of Cardiovascular Surgery*, 2002, 43:77.
7. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *The Journal of pathology*, 2000, 190: 255-266.
8. 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.
9. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovascular surgery*, 2002, 10: 620-630.

10. Turchanyi B, Toth B, Racz I, Vendég Z, Furesz J, Hamar J. Ischemia reperfusion injury of the skeletal muscle after selective deafferentation. *Physiological Research*, 2005, 54: 25-32.
11. Hougee S, Hartog A, Sanders A, Graus YM, Hoijer MA, Garssen J, van den Berg WB, van Beuningen HM, Smit HF. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 531: 264-269.
12. Hu L, Zhang Y, Lim PS, Miao Y, Tan C, McKenzie KU, Schyvens CG, Whitworth JAJA Joh. Apocynin but not L-arginine prevents and reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. *American Journal of Hypertension*, 2006, 19: 413-418.
13. Connell BJ, Saleh MC, Khan BV, Saleh TM. Apocynin may limit total cell death following cerebral ischemia and reperfusion by enhancing apoptosis. *Food and chemical toxicology*, 2011, 49: 3063-3069.
14. Chiang C-H, Chuang C-H, Liu S-L. Apocynin attenuates ischemia-reperfusion lung injury in an isolated and perfused rat lung model. *Translational Research* 2011, 158: 17-29.
15. Li M, Liu Z, Zhuan L, Wang T, Guo S, Wang S, Liu J, Ye Z. Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. *Molecular Medicine Reports*, 2013, 7: 47-52.
16. Lull ME, Levesque S, Surace MJ, Block ML. Chronic apocynin treatment attenuates beta amyloid plaque size and microglial number in hAPP (751) SL mice. *PloS one*, 2011, 6: e20153.

17. Philippens IH, Wubben JA, Finsen B, A't Hart BJJNP. Oral treatment with the NADPH oxidase antagonist apocynin mitigates clinical and pathological features of parkinsonism in the MPTP marmoset model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2013, 8: 715-726.
18. Xu M, Dai D, Zhang Q, Cheng Y, Dai Y. Upregulated NADPH oxidase contributes to diabetic testicular complication and is relieved by strontium fructose 1, 6-diphosphate. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2010, 118: 459-465.
19. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Universitatis Carolinae. Medica. Monographia*, 1990, 137: 1-53.
20. Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis M-K, Prigouris P, Bakos D, Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Andrianakis I, Betrosian A, Tsoukalas GD. Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock: the role of hypoxemic resuscitation. *PloS one*, 2012, 7: e32968.
21. Jaeschke H. Physiology L. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2003, 284: G15-G26.
22. Volkman R. Die ischaemischen muskellahmungen und kontrakturen. *Centralbl Chir*, 1881, 8: 801-803.
23. Cannon W. Traumatic Shock. *New York, Appleton-Century-Crofts*, 1923.
24. Jepson PN. Ischaemic contracture: experimental study. *Annals of surgery*, 1926, 84: 785.
25. Haimovici H. Muscular, renal, and Metabolic complications of acute arterial occlusions and related conditions.(Myonephropathic metabolic syndrome). *Surgjournal*, 1989: 386-408.

26. Norwood M, Bown M, Sayers R. Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2004, 28: 234-245.
27. Ozcan O, Erdal H, Yonden Z. İskemi-Reperfüzyon Hasari Ve Oksidatif Stres İlişkisine Biyokimyasal Bakış. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 6: 27-33.
28. Damjanov I, Linder J, Anderson WAD. *Anderson's pathology*, 1996.
29. Tekin İ. İloprost'un deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde femoral arter endoteli ve gastroknemius kası hasarı üzerine etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi*, 2007.
30. Belkin M, Brown RD, Wright JG, LaMorte WW, Hobson II RW. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *The American Journal of Surgery*, 1988, Pages 83-86 1988, 156: 83-86.
31. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2011, 301: H1723-H1741.
32. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *The British journal of cancer*, 1987, 8: 66.
33. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357: 1121-1135.
34. Petrônio MS, Zeraik ML, Fonseca LMd, Ximenes V. Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. *Molecules*, 2013, 18: 2821-2839.
35. Kim JY, Park J, Lee JE, Yenari MA. NOX inhibitors-a promising avenue for ischemic stroke. *Experimental Neurobiology*, 2017, 26: 195-205.

36. Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of inflammation*, 2008, 2008.
37. Wang Q, Smith RE, Luchtefeld R, Sun AY, Simonyi A, Luo R, Sun GY. Bioavailability of apocynin through its conversion to glycoconjugate but not to diapocynin. *Phytomedicine*, 2008, 15: 496-503.
38. Otto TH. Über die synthese des acetovanillons aus guajacol und eisessig. *Berichte*, 1891, 24: 2869-2870.
39. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY. Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular medicine*, 2008, 10: 259-274.
40. Stolk J, Hiltermann T, Dijkman J, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1994, 11: 95-102.
41. Mühlenbeck U, Barz W. Cytochrome-P450-dependent formation of α -hydroxyacetovanillone from acetovanillone in *Solanum khasianum*. *Phytochemistry*, 1997, 44: 865-867.
42. Johnson DK, Schillinger KJ, Kwait DM, Hughes CV, Ishmael F, O'Donnell RW, Chang M-M, Hogg MG, Dordick JSJE. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. *Journal of Endothelial Cell Research*, 2002, 9: 191-203.
43. Lafeber F, Beukelman C, Van Den Worm E, Van Roy J, Vianen M, Van Roon J, Van Dijk H, Bijlsma JJ. Apocynin, a plant-derived, cartilage-saving drug, might be useful in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 1999, 38: 1088-1093.

44. Peters EA, Hiltermann JT, Stolk J. Effect of apocynin on ozone-induced airway hyperresponsiveness to methacholine in asthmatics. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 31: 1442-1447.
45. Smit H, Kroes B, Van den Berg A, Van der Wal D, Van den Worm E, Beukelman C, Van Dijk H, Labadie RP. Immunomodulatory and anti-inflammatory activity of *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 73: 101-109.
46. Simons JM, A't Hart B, Ching TRIV, Van Dijk H, Labadie RP. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, 8: 251-258.
47. Van den Worm E, Beukelman CJ, Van den Berg AJ, Kroes BH, Labadie RP, Van Dijk HJ. Effects of methoxylation of apocynin and analogs on the inhibition of reactive oxygen species production by stimulated human neutrophils. *European Journal of Pharmacology*, 2001, 433: 225-230.
48. Stolk J, Rossie W, Dijkman JH. Apocynin improves the efficacy of secretory leukocyte protease inhibitor in experimental emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1994, 150: 1628-1631.
49. Touyz RM. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. *Hypertension*, 2008, 51: 172-174.
50. Müller AA, Reiter SA, Heider KG, Wagner H. Plant-derived acetophenones with antiasthmatic and anti-inflammatory properties: inhibitory effects on chemotaxis, right angle light scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes. *Planta medica*, 1999, 65: 590-594.

51. Muijsers R, van Den Worm E, Folkerts G, Beukelman C, Koster A, Postma D, Nijkamp FP. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. *British Journal of Pharmacology*, 2000, 130: 932-936.
52. Drake RL, Vogl W, Mitchell AW, Gray H, Tibbitts RM, Richardson P, Horn A, Yıldırım M. *Tıp fakültesi öğrencileri için Gray's anatomi*. Baskı. Güneş Tıp Kitabevleri, 2007.
53. Kilinc K, Kilinc A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri de, *Hacettepe*, 2002, 33: 110-118.
54. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest radikaller. 2012, 1: 52-58.
55. Marzatico F, Cafe C. Oxygen radicals and other toxic oxygen metabolites as key mediators of the central nervous system tissue injury. *Functional neurology*, 1993, 8: 51-66.
56. Young I, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 2001, 54: 176-186.
57. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *PNAS*, 1993, 90: 7915-7922.
58. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 2000, 109: 33-44.
59. DüNDAR Y. Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. *Afyon Kocatepe Üniversitesi*, 2000.
60. Greenstock CL. Radiation and aging: free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Medical hypotheses*, 1993, 41: 473-482.
61. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları*, 1995, 32.

62. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1990, 280: 1-8.
63. Davies S, Reichardt-Pascal S, 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.
64. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 2001, 31: 1287-1312.
65. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Annals of Internal Medicine*, 1980, 93: 480-489.
66. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, 1989, 9: 1-8.
67. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *Journal of Investigative Surgery*, 2002, 2: 248-258.
68. Karabulut H, Gülay M. Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2016, 4.
69. Vitaminler OFA. *Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Konferans Kitapçığı*, 1999.
70. 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.
71. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *The American journal of medicine*, 1991, 91: S23-S30.
72. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annual review of biochemistry*, 1994, 120: 227-237.

73. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2002, 22: 442-448.
74. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 1982, 47: 412-426.
75. Köse K, Doğan P. Lipid peroksidasyonu. 1992, 1992: 340-350.
76. Sinclair A, Barnett A, Lunec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *British Journal of Hospital Medicine*, 1990, 43: 334-344.
77. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *New England Journal of Medicine*, 1986, 548: 9-37.
78. Devasagayam T, Boloor K, Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 2003.
79. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 1994, 74: 139-162.
80. Devasagayam T, Tilak J, Boloor K, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *JAPI*, 2004, 52: 4.
81. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 2002, 18: 872-879.
82. Kuraoka I, Robins P, Masutani C, Hanaoka F, Gasparutto D, Cadet J, Wood RD, Lindahl T. Oxygen free radical damage to DNA translesion synthesis by human DNA polymerase η and resistance to exonuclease action at cyclopurine deoxynucleoside residues. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 49283-49288.

83. Dick F, Li J, Giraud M-N, Kalka C, Schmidli J, Tevæearai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb ischemia. *Circulation*, 2008, 118: 1920-1928.
84. Bilal MS, Sarioğlu T. İskemik Miyokard İnjurisi ve İntraoperatif Miyokard Korunmasına Genel Bir Bakış. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, 1992, 1: 118-126.
85. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39: 44-84.
86. Aydemir B, SARI EK. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2009, 2: 56-60.
87. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, 2011, 1083: 1-37.
88. Beckman G, Lundgren E, Tärnvik A. Superoxide dismutase isozymes in different human tissues, their genetic control and intracellular localization. *Human heredity*, 1973, 23: 338-345.
89. Aliakbar S, Brown P, Bidwell D, Nicolaides KH. Human erythrocyte superoxide dismutase in adults, neonates, and normal, hypoxaemic, anaemic, and chromosomally abnormal fetuses. *Clinical biochemistry*, 1993, 26: 109-115.
90. Tekkes Y. Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Kahramanmaraş*, 2006: 2-26.
91. Werns SW, Shea MJ, Lucchesi BR. Free radicals and myocardial injury: pharmacologic implications. *Circulation*, 1986, 74: 1-5.

92. Zámocký M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in biophysics and molecular biology*, 1999, 72: 19-66.
93. Günaydın B. Çelebi H. Genel anesteziklerin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkisi. *Anestezi Derg*, 2003, 11: 87-98.
94. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2004, 61: 192-208.
95. Zhao J, Liu X-J, Ma J-W, Zheng RL. DNA damage in healthy term neonate. *Early human development*, 2004, 77: 89-98.
96. Naito Y, Masaichi C-iL, Kato Y, Nagai R, Yonei Y. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicine*, 2010, 7: 36-44.
97. Ishikawa T, Zimmer M, Sies H. Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS letters*, 1986, 200: 128-132.
98. Toribio F, Martinez-Lara E, Pascual P, Lopez-Barea J. Methods for purification of glutathione peroxidase and related enzymes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1996, 684: 77-97.
99. Tucker EM. Some physiological aspects of genetic variation in the blood of sheep 1. *Animal blood groups and biochemical genetics*, 1976, 7: 207-215.
100. Rizzi R, Caroli A, Bolla P, Acciaioli A, Pagnacco G. Variability of reduced glutathione levels in Massese ewes and its effect on daily milk production. *Journal of Dairy Research*, 1988, 55: 345-353.
101. Champe PC, Harvey RA. Glikozaminoglikanlar. *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*, 1997.
102. Kalaycıoğlu L. Merinos koyunlarında eritrosit glutatyon değerleri üzerinde araştırmalar. *SÜ Vet. Fak. Derg. Özel Sayı*, 1984: 141-147.

103. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. İçinde: *Free radicals in diagnostic medicine*, Springer, 1994: 1-15.
104. Dormandy TL. An approach to free radicals. *The lancet*, 1983, 322: 1010-1014.
105. Bruice TC, Liebman JF, Greenberg A. Mechanistic principles of enzyme activity. VCH, New York, 1988.
106. Akkuş İ. Serbest Oksijen Radikalleri ve Fizyopatolojik Etkileri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 1995: 1-15.
107. Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, 1996, 96: 693-702.
108. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 2000; 108: 652-9.
109. Halliwell B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease; Encyclopedia of Life Sciences. *Engyclopedia of Life Science*, 2001.
110. Ribeiro CT, Milhomem R, De Souza DB, Costa WS, Sampaio FJ, Pereira-Sampaio MA. Effect of antioxidants on outcome of testicular torsion in rats of different ages. *The Journal of Urology | Urology Practice*, 2014, 191: 1578-1585.
111. Yücel A, Aydoğan MS, Ucar M, Sarıcı KB, Karaaslan MG In Effects of Apocynin on Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Transplantation Proceedings*, 2019; 1180-1183.
112. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193: 265-275.
113. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, Mori M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1979, 135: 372-376.

114. Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica chimica acta*, 1991, 196: 143-151.
115. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*, 1969, 27: 502-522.
116. Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. *Nephrol Dial Transplant*, 1999, 14: 76-78.
117. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia—a preliminary report. *The Journal of emergency medicine*, 2000, 19: 311-315.
118. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 1988, 34: 497-500.
119. Matkovics B. Determination of enzyme activity in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laboratoriumi Diagnosztika*, 1988, 15: 248-250.
120. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry*, 1966, 16: 359-364.
121. Ball CR. Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment: relevance to protection against nitrogen mustards. *Biochemical Pharmacology*, 1966, 15: 809-816.
122. Fernandez V, Videla LA. Effect of acute and chronic ethanol ingestion on the content of reduced glutathione of various tissues of the rat. *Experientia*, 1981, 37: 392-394.

123. Ricardo SD, Diamond JR. In The role of macrophages and reactive oxygen species in experimental hydronephrosis. *Seminars in nephrology*, 1998; 612-621.
124. Matin SF, NOVICK AC. Renal dysfunction associated with staged bilateral partial nephrectomy: the importance of operative positioning. *The Journal of urology*, 2001, 165: 880-881.
125. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. In The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. *Transplantation proceedings*, 2002; 2518-2519.
126. Landry GJ, Lau IH, Liem TK, Mitchell EL, Moneta GL. Adjunctive renal artery revascularization during juxtarenal and suprarenal abdominal aortic aneurysm repairs. *The American Journal of Surgery* 2010, 199: 641-645.
127. Zhou S-P, Liao W-T, Yang L-K, Sun L. Effects of sevoflurane pretreatment on renal Src and FAK expression in diabetic rats after renal ischemia/reperfusion injury. *Molecular and cellular biochemistry*, 2013, 384: 203-211.
128. Hammersen F, Barker J, Gidlöf A, Menger M, Hammersen E, Messmer K. The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia and reperfusion. *Ischemia and Reperfusion*. Karger Publishers, 1989: 1-26.
129. Romanini CV, Ferreira EDF, Soares LM, Santiago AN, Milani H, de Oliveira RMW. 4-hydroxy-3-methoxy-acetophenone-mediated long-lasting memory recovery, hippocampal neuroprotection, and reduction of glial cell activation after transient global cerebral ischemia in rats. *Journal of Neuroscience Research*, 2015, 93: 1240-1249.
130. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein GM. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, 1982, 78: 206-209.

131. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Melatonin reduces ischemia/reperfusion-induced superoxide generation in arterial wall and cell death in skeletal muscle. *Journal of Pineal Research*, 2006, 41: 255-260.
132. Engels F, Renirie BF, 't Hart BA, Labadie RP, Nijkamp FP. Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of *Picrorhiza kurroa*, on arachidonic acid metabolism. *Federation of European Biochemical Societies*, 1992, 305: 254-256.
133. Liu SX, Chiang C, Yao Q, CHIOU GC. Increase of ocular blood flow by some phytogetic compounds. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 1996, 12: 95-101.
134. Barbieri SS, Cavalca V, Eligini S, Brambilla M, Caiani A, Tremoli E, Colli S. Apocynin prevents cyclooxygenase 2 expression in human monocytes through NADPH oxidase and glutathione redox-dependent mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 37: 156-165.
135. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2015, 6: 331-336.
136. Hosseini F, Naseri MG, Badavi M, Ghaffari M, Shahbazian H, Rashidi I. Effect of beta carotene on lipid peroxidation and antioxidant status following renal ischemia/reperfusion injury in rat. *Journal Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2010, 70: 259-263.
137. Kizilgun M, Poyrazoglu Y, Oztas Y, Yaman H, Cakir E, Cayci T, Akgul OE, Kurt YG, Yaren H, Kunak Z. Beneficial effects of N-acetylcysteine and ebselen on renal ischemia/reperfusion injury. *Journal Renal Failure*, 2011, 33: 512-517.

138. Beytur A, Binbay M, Sarihan ME, Parlakpınar H, Polat A, Gunaydin MO, Acet A. Dose-dependent protective effect of ivabradine against ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Kidney Blood Press Res*, 2012, 35: 114-119.
139. Jin L, Lagoda G, Leite R, Webb RC, Burnett AL. NADPH oxidase activation: A mechanism of hypertension-associated erectile dysfunction. *Journal International Society for Sexual Medicine*, 2008, 5: 544-551.
140. Kabel AM. Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*, 2014, 2: 35-38.
141. Liu P-G, He S-Q, Zhang Y-H, Wu J. Protective effects of apocynin and allopurinol on ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *World J Gastroenterol*, 2008, 14: 2832.
142. Atahan E, Ergun Y, Kurutas EB, Cetinus E, Ergun UG. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. *Journal of Surgical Research*, 2007, 137: 109-116.
143. Yarıktaş M, Döner F, Doğru H, Aynalı G, Yönden Z, Delibaş N. Baş-boyun malign tümörlerinde malondialdehit düzeyleri ve antioksidan enzim aktiviteleri. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2003, 10.
144. Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia–reperfusion injury in rats. *Journal of Andrology*, 2010, 89: 314-320.
145. Emmez H, Yildirim Z, Kale A, Töngel M, Durdağ E, Börcek AÖ, Uçankuş LN, Doğulu F, Kiliç N, Baykaner MK. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of alpha-lipoic acid on spinal cord ischemia–reperfusion injury in rabbits. *Acta Neurochirurgica*, 2010, 152: 1591-1601.

146. Chang R, Li Y, Yang X, Yue Y, Dou L, Wang Y, Zhang W, Li X. Protective role of deoxyschizandrin and schisantherin A against myocardial ischemia–reperfusion injury in rats. *PloS one*, 2013, 8: e61590.
147. 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: e39-e46.
148. Bashir SO, Mostafa OA, Rizk MS, Al-Ridi MR, Morsy MD. Intestinal ischemic preconditioning modulates oxidative stress in rat's spinal cord ischemic reperfusion injury. *American Journal of Biomedical Sciences*, 2012, 4: 220-232.
149. Wu K, Lei W, Tian J, Li H. Atorvastatin treatment attenuates renal injury in an experimental model of ischemia–reperfusion in rats. *BMC nephrology*, 2014, 15: 14.
150. Kertmen H, GÜRER B, HASANBASOĞLU A, MENTEŞE A, YILMAZ ER, Özlem U, Altay DU, ARIKÖK AT, ŞEKERCİ Z, TÜREDİ S. Ischemia Modified Albumin Levels in Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury: an Experimental Study. *Journal of Neurological Sciences*, 2014, 31: 115-125.
151. Guven C, Borcek AO, Cemil B, Kurt G, Yildirim Z, Ucanus NL, Kilic N, Ceviker N. Neuroprotective effects of infliximab in experimental spinal cord ischemic injury. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2010, 17: 1563-1567.
152. Kurt G, Yildirim Z, Cemil B, Celtikci E, Kaplanoglu GT. Effects of curcumin on acute spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Journal of Neurosurgery*, 2014, 20: 464-470.
153. Dong X, Xing Q, Li Y, Han X, Sun L. Dexmedetomidine protects against ischemia–reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Journal of Surgical Research*, 2014, 186: 240-245.

154. Şener TE, Yüksel M, Özyılmaz-Yay N, Ercan F, Akbal C, Şimşek F, Şener G. Apocynin attenuates testicular ischemia–reperfusion injury in rats. *Journal of Pediatric Surgery*, 2015, 50: 1382-1387.
155. Choi E, Jung H, Kwak K, Yeo J, Yi S, Park C, Ryu T, Jeon Y, Park K, Lim D. In Effects of allopurinol and apocynin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplantation Proceedings*, 2015; 1633-1638.
156. Li Z, Wang Y. Effect of NADPH oxidase inhibitor-apocynin on the expression of Src homology-2 domain-containing phosphatase-1 (SHP-1) exposed renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Toxicology reports*, 2015, 2: 1111-1116.
157. Duran A, Ciloglu S, Sehirli O, Yigit A, Buyukdogan H, Duran A, Elcioğlu K, Kabasakal L. Apocynin and dimethyl sulfoxide synergistically protect against ischemia-reperfusion injury in a rat hind limb ischemia-reperfusion model. *European Journal of Plastic Surgery*, 2017, 40: 507-512.
158. Yıldırım BA, Albayra S. Technology, Engineering, Mathematics. Protective Effects of Crocin on Experimental Gastrocnemius Muscle Ischemia/Reperfusion Model in Rat. *The Eurasia Proceedings of Science, Technology, Engineering & Mathematics (EPSTEM)*, 2018 3: 116-120.
159. Ertekin A, Apaydin Yildirim B. Protective Effects of Hesperidin and Coenzyme Q10 on Experimental Gastrocnemius Muscle Ischemia/Reperfusion Model in Rats. *International Journal of Veterinary Health Science & Research*, 2018, 6: 219-224.
160. Özer M. Deneysel alt ekstremite iskemi reperfüzyon modelinde aposinin'in iskelet kası üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması/The investigation of apocynin's protective effects on skeletal muscle of experimental lower extremity ischemia-reperfusion model. *openaccess.firat.edu.tr*, 2015.

161. Mari M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, 11: 2685-2700.
162. Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *IJBB*, 2009.
163. Zhang J, Gu H-D, Zhang L, Tian Z-J, Zhang Z-Q, Shi X-C, Ma W-H. Protective effects of apricot kernel oil on myocardium against ischemia–reperfusion injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49: 3136-3141.
164. El-Beltagi HS, Mohamed HI. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2013, 41: 44-57.
165. Slyshenkov VS, Rakowska M, Moiseenok AG, Wojtczak L. Pantothenic acid and its derivatives protect Ehrlich ascites tumor cells against lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 19: 767-772.
166. van Haaften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Journal Drug Metabolism Reviews*, 2003, 35: 215-253.
167. Slemmer JE, Shacka JJ, Sweeney M, Weber JT. Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15: 404-414.
168. Charles A-L, Guilbert A-S, Guillot M, Talha S, Lejay A, Meyer A, Kindo M, Bouitbir J, Zoll J, GENY B. Muscles susceptibility to ischemia-reperfusion injuries depends on fiber type specific antioxidant level. *Frontiers in Physiology*, 2017, 8: 52.
169. Gunduz A, Turedi S, Mentese A, Karahan SC, Hos G, Tatlı O, Turan I, Ucar U, Russell RM, Topbas M. Ischemia-modified albumin in the diagnosis of acute

mesenteric ischemia: a preliminary study. *The American Journal of Emergency Medicine*, 2008, 26: 202-205.

170. Marx G, Chevion M. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate. *Biochemical Journal*, 1986, 236: 397-400.

171. Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, Yang J, Ortega-Lopez AM, Shinoda H, Honda SA, Rios CN, Sugiyama CE, Ha C-E. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clinical Chemistry*, 2003, 49: 581-585.

172. Sbarouni E, Georgiadou P, Kremastinos DT, Voudris V. Ischemia modified albumin: is this marker of ischemia ready for prime time use. *Hellenic J Cardiol*, 2008, 49: 260-266.

173. Bar-Or D, Winkler JV, VanBenthuyzen K, Harris L, Lau E, Hetzel F. Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: a preliminary comparison to creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I. *American Heart Journal*, 2001, 141: 985-991.

174. Cho DK, Choi J-H, Kim SH, Choi J, Rhee I, Ki C-S, Lee S-C, Gwon H-C. Ischemia-modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary vasospasm. *Coronary Atery Disease*, 2007, 18: 83-87.

175. Guven S, Alver A, Mentese A, Ilhan FC, Calapoglu M, Unsal MA. The novel ischemia marker 'ischemia-modified albumin' is increased in normal pregnancies. *Acta Obstetricia et Gynecologica*, 2009, 88: 479-482.

176. Turedi S, Gunduz A, Mentese A, Karahan SC, Yilmaz SE, Eroglu O, Nuhoglu I, Turan I, Topbas M. Value of ischemia-modified albumin in the diagnosis of pulmonary embolism. *The American Journal of Emergency Medicine*, 2007, 25: 770-773.

177. Mentese A, Mentese U, Turedi S, Gunduz A, Karahan S, Topbas M, Turan A, Patan T, Turkmen S, Okur G. Effect of deep vein thrombosis on ischaemia-modified albumin levels.*Emergeny Medicine Journal*, 2008, 25: 811-814.
178. Köksal H, Kurban S, Şahin M. Laparoskopik kolesistektomi süresince Splanknik sahadaki hemodinamik değışikliklerin değlendirilmesinde iskemi modifiye albuminin rolü. *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 2010, 26.
179. Shacter E. Protein oxidative damage.*Methods in enzymology*, 2000: 428-436.
180. Çakatay U, Kayalı R. Protein oksidasyonunun klinik önemi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 2004, 35.
181. Çakmak VA, Gündüz A, Karaca Y, Alioğlu Z, Menteşe A, Topbaş M. Diagnostic Significance of Ischemia-Modified Albumin, S100b, and Neuron-Specific Enolase in Acute Ischemic Stroke. *The Journal Of Academic Emergency Medicine*, 2014, 13.
182. Ali OS, Abdelgawad HM, Mohammed MS, El-Awady RR. Ischemic heart diseases in Egypt: role of xanthine oxidase system and ischemia-modified albumin *Heart and vessels*, 2014, 29: 629-637.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Selçuk ALBAYRAK Doğum tarihi: 01.01.1993 Doğum yeri: Erzurum Medeni hali: Bekâr Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 25240 ERZURUM Tel: 0539 929 72 43 Faks: - E-mail: albayrak.s@yahoo.com
Eğitim
Lise: Mecidiye Anadolu Lisesi (2011) Lisans: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2011-2016) Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı (2016-2019)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derece _____ Almanca: - _____ Rusça: - _____
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
-
İlgi Alanları ve Hobiler
Ney Üfleme/Eğitimi, Kitap Okumak, Tiyatro Seyretmek,

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

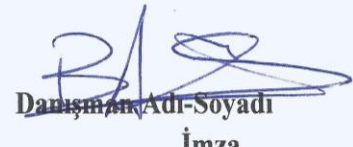
Yüksek Lisans Tezi olarak Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM danışmanlığında sunulan “**Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Alt Ekstremité İskemi-Reperfüzyon Hasarında Aposinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	6	15
Genel Bilgiler	17	30
Materyal ve Metod	21	35
Bulgular	6	10
Tartışma	13	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 22 / 07/ 2019


Öğrenci Adı-Soyadı
İmza

Selçuk ALBAYRAK


Danışman Adı-Soyadı
İmza

Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



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

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1700334726
Konu : HADYЕК Kararı.

04.12.2017

VETERİNER FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 29.11.2017 tarihli ve 36643897-000-E.1700331428 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 30.11.2017 tarih ve 13 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 175 no'lu kararı ile sözkonusu yüksek lisans tez çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 30.11.2017

Toplantı Sayısı : 13

KARAR N0 175: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Veteriner Hekimliği Temel Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr.Betül APAYDIN YILDIRIM'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Alt Ekstremité İskemi-Reperfüzyon Hasarında Aposinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Dekanlığının 27.11.2017 tarih ve 36643897-000-E.1700331428 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

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

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/birim=veteriner-fakultesi>

Kep Adresi: atauni@is01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vevfak@atauni.edu.tr



Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERM2/Record/Confirmation/Confirmation?code=5316805>