



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KALP İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA  
ZERDEÇAL (*CURCUMA LONGA*)'IN GPER-1 VE  
OKSİDATİF/NİTROZATİF STRES  
BİYOMARKIRLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**SEDA İKİKARDEŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ 2017**

**T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**KALP İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA  
ZERDEÇAL (*CURCUMA LONGA*)'IN GPER-1 VE  
OKSİDATİF/NİTROZATİF STRES  
BİYOMARKIRLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**SEDA İKİKARDEŞ  
YÜKSEK LİSANS**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ 2017**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Seda İKİKARDEŞ tarafından hazırlanan “Kalp İskemi Reperfüzyon Hasarında Zerdeçal (*Curcuma longa*)’ın GPER-1 ve Oksidatif/Nitrozatif Stres Biyomarkırları Üzerine Etkisinin Araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 27/12/2017 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ .....

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, K.S.Ü

Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN .....

Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, K.S.Ü

Doç. Dr. Ali Erdinç YALIN .....

Biyokimya Ana Bilim Dalı, M.E.Ü

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. MEHMET BOŞNAK .....

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Seda İKİKARDEŞ



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2017/1-64YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Eğitimim süresi boyunca her türlü engin tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini aldığım ve fikirlerinden faydalandığım saygı değer hocam Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'a,

Eğitimim sırasında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocam Prof. Dr. Metin KILINÇ'a, diğer öğretim üyeleri hocalarım Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN'e, Yrd. Doç. Dr. Muhammed SEYİTHANOĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. Filiz ALKAN BAYLAN'a,

Tez çalışmamda histopatolojik incelemeleriyle önemli katkısı olan, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi hocam Prof. Dr. Sevgi BAKARIŞ'e,

Tez çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Meltem GÜNGÖR'e, Arş. Gör. Hasan DAĞLI'ya, değerli arkadaşım doktora öğrencisi Safiye Şeyma TANER'e

Her zaman maddi manevi yanımda olan, her türlü desteğini üzerimden hiç bir zaman eksik etmeyen çok değerli babam Yaşar ERGÜN ve çok değerli annem Nevin ERGÜN'e, sevgili eşim İbrahim İKİKARDEŞ'e ve aileme en içten teşekkürü bir borç bilirim.

Bu araştırma, 2017/1-64YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Aralık-2017

Seda İKİKARDEŞ

# KALP İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA ZERDEÇAL (*CURCUMA LONGA*)'IN GPER-1 VE OKSİDATİF/NİTROZATİF STRES BİYOMARKIRLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Seda İKİKARDEŞ

## ÖZET

**Giriş ve Amaç:** İskemi sonrasında reperfüzyonun sebep olduğu ağır derecede oksidatif stres ciddi işlevsel ve yapısal hasarlar oluşturmaktadır. Bu hasardan ise asıl olarak serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır. Son yıllarda farklı organlarla yapılan çalışmalarda reperfüzyon kaynaklı olan hasara karşı iskemik ön koşullama gibi yöntemlerden ziyade birçok antioksidan maddenin koruyucu etkileri belirtilmiştir. Kardiyovasküler hastalıklar ile östrojen arasında bir bağlantı olduğu bilinmektedir. Östrojenin hücrenel olan hipertrofiyi azaltması, damar duvarının elastikiyetini artırması, antioksidan ve antienflamatuar özelliklere sahip olmasından dolayı kadınlarda iskemik kalp riskini azaltmaktadır. Östrojen, östrojen reseptörleri alfa ve beta üzerinde etkilidir ki, son zamanlarda yeni olan bir G proteinine bağlı östrojen reseptörü 1 (GPER-1) saptanmıştır. Zerdeçal (*Curcuma longa*), anavatanı Hindistan olan zerdeçal bitkisinin rizomlarından üretilmektedir. Yapılan çeşitli araştırmalarda zerdeçal ekstresinin hipoglisemik, antienflamatuar, antioksidan ve lipit düşürücü etkilerde bulunduğu gösterilmiştir. Yapılan literatür taramalarında kardiyovasküler hastalıklarda zerdeçal ile ilgili çalışmalara rastlanmamaktadır. İlk defa yapılan bu çalışmada, sıçanlara tedavi olarak verilen zerdeçalın kalp iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarında GPER-1 ve oksidatif/nitrozatif stres parametreleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda 24 adet 250-300 gram ağırlığında olan erkek Wistar-Albino cinsi rat kullanıldı. Deneyimiz 3 gruptan oluştu. Grup 1 (kontrol grubu) (n=8): Sadece iskemi reperfüzyon uygulanması. Grup 2 (sham grubu) (n=8): Kalp iskemi reperfüzyon + 1 mL intraperitoneal (IP) yolla serum fizyolojik (%0,9 NaCl) verildi. Grup 3 (tedavi grubu) (n=8): Kalp iskemi reperfüzyon + 1 mL zerdeçal (50 mg/kg/mL/gün) IP yolla uygulandı.

Sham ve zerdeçal gruplarındaki ratlara günde bir kez ve 7 gün boyunca 1 mL serum fizyolojik (% 0,9 NaCl/kg/mL/gün) ve 1 mL zerdeçal (50 mg/kg/mL/gün) IP yolla verilirken kontrol grubundakilere hiçbir şey uygulanmadı. Daha sonrasında ise tüm gruptaki ratlara girişim ve cerrahi işlemden sonra kalpte 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyon oluşturuldu. Deney bitiminden sonra tüm ratlar sakrifiye edilip kalp dokuları çıkarıldı. Dokular iki eşit parçaya bölündü ve bir parçası formaldehit içerisinde histopatolojik analiz için saklandı. Kalan diğer parçası ise biyokimyasal parametrelerin analizi için saklandı. Kalp dokusunda oksidatif/nitrozatif stresin biyobelirteçleri olarak glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), superoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve nitrotirozin (3-NT) düzeyleri ile GPER-1 düzeyleri ölçüldü.

**Bulgular:** Biyokimyasal incelemelerin sonucunda; kontrol ve sham grubu arasında tüm parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p<0,05$ ). Sham ve tedavi grubu arasında NO, 3-NT ve GPx hariç diğer parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p<0,05$ ). Kontrol ve tedavi grupları arasında tüm parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p<0,05$ ). Tedavi grubunda GPER-1 düzeyi kontrole göre oldukça yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Histopatolojik olarak kontrol ve sham grubunda PNL infiltrasyonu, hemoraji, ödem ve miyositolizis gözlenirken tedavi grubunda sadece hemoraji gözlemlendi.

**Sonuç:** Veriler incelendiğinde, GPER-1 reseptör düzeyi, kalp iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarı için bir aday biyolojik belirteç durumunda olabileceği görülmektedir. Nitekim, sonuçlarda zerdeçal grubunda antioksidan aktivitenin yüksek, oksidatif/nitrozatif stres düzeylerinin düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum zerdeçal bitkisinin kalp İ/R hasarı üzerine antioksidan olma özelliğine bağlı olarak koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** GPER-1, kalp iskemi reperfüzyon hasarı, oksidatif/nitrozatif stres, zerdeçal

**Sayfa Adedi:** 87

**Danışman:** Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF TURMERIC (*Curcuma longa*) ON GPER-1  
AND OXIDATIVE/NITROSATIVE STRESS BIOMARKERS IN CARDIAC  
ISCHEMIA REPERFUSION INJURY**

**Master Thesis  
Seda İKİKARDEŞ**

**ABSTRACT**

**Introduction and Aim:** Extreme oxidative stress induced by reperfusion after ischemia causes functional and structural damages. Free oxygen radicals are mainly considered as responsible for the damage. In recent years in studies conducted in different organs the protective effect of a number of antioxidant substances rather than ischemic preconditioning methods against damages originating from reperfusion have been indicated. It has been known that there is a connection between cardiovascular diseases and oestrogen. Oestrogen's reducing cellular hypertrophy, increasing elasticity of vein wall, and having antioxidant and anti-inflammatory features reduce the ischemic heart risk in women. Oestrogen is effective on oestrogen receptors alpha and beta and also recently a new oestrogen receptor depending on G protein has been determined (GPER1). Turmeric (*Curcuma longa*) is produced from rhizoms of turmeric plant whose cradle is India. It has been revealed in various researches that turmeric has hypoglycaemic, anti-inflammatory, antioxidant and lipid reducing effects. In literature reviews, studies about turmeric have been found in cardiovascular diseases. In this first study, investigation of the effect of the turmeric given as a treatment to rats on heart ischemia reperfusion of GPER-1 and on oxidative/nitrosative stress parameters has been aimed.

**Material and Method:** 24 rats which are male Wistar-Albino weighing 250-300 grams were used in our study. Our experiment consisted of three groups. Group 1 (Control Group) (n=8): using only ischemia reperfusion. Group 2 (Sham Group) (n=8): heart ischemia reperfusion + 1 mL of physiological saline was given intraperitoneally (IP) (% 0,9 NaCl). Group 3 (Treatment



Group) (n=8): heart ischemia reperfusion + 1 mL of turmeric was given intraperitoneally (IP). While it was given 1 mL of saline physiologically (% 0,9 NaCl/kg/mL/day) and 1 mL of turmeric (50 mg/kg/mLday) intraperitoneally to sham and turmeric group once a day during 7 days, it wasn't given anything to control group. Then 10 minutes ischemia and 10 minutes reperfusion was created in all rats in three groups after intervention and surgery. After the end of experiment, all rats were sacrificed and heart tissues were removed. The tissues were divided into two equal parts and one of them was reserved for histopathological analysis into formaldehyde. The other part was reserved for analysis of biochemical parameters. Glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), nitrotyrosine (3-NT) and GPER-1 levels were measured as oxidative/nitrosative biomarkers in heart tissue.

**Findings:** As a result of biochemical studies, statistically significant differences were found between control and sham groups in terms of all parameters ( $p < 0,05$ ). Statistically significant differences were found between treatment and sham groups in terms of other parameters except NO, 3-NT and GPx ( $p < 0,05$ ). Statistically significant differences were found between treatment and control groups in terms of other parameters ( $p < 0,05$ ). GPER-1 levels in treatment group were significantly higher than control group ( $p < 0,05$ ). Histopathologically in control and sham groups PNL infiltration, hemorrhage, edema and myocytolysis were observed whereas only hemorrhage was observed in the treatment group.

**Result:** When data are examined, it seems that GPER-1 receptor level may be a candidate biological indicator for heart ischemia reperfusion damage. Thus, it has been observed that antioxidant activity in turmeric group is high and oxidative/nitrosative stress level is low. As a result of this situation, it is considered that turmeric plant may have a protective effect on heart ischemia reperfusion damage due to its antioxidant feature.

**Key words:** Cardiac ischemia reperfusion injury, GPER-1, oxidative/nitrosative stress, turmeric.

**Page Number:** 87

**Supervisor:** Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	I
ÖZET .....	II
ABSTRACT .....	IV
İÇİNDEKİLER.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
1.1. İskemi/Reperfüzyon.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kalbin Yapısı ve Temel Fonksiyonları.....	3
2.2. Kalpte İskemi/Reperfüzyon Hasarı .....	4
2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı .....	5
2.3.1. İskemi/Reperfüzyon hasarının mekanizması .....	5
2.3.2. Endotel hücrelerinin rolü .....	7
2.3.3. Nötrofillerin rolü .....	8
2.4. GPER-1.....	9
2.4.1. G protein kenetli reseptörler (GPER-1) .....	10
2.4.1.1. Heterotrimerik G proteinleri.....	11
2.4.1.2. Küçük G proteinleri.....	11
2.4.1.2.1. Rho.....	12
2.4.1.2.2. Rho/Rho-kinaz yolağı.....	13
2.5. Oksidatif/Nitrozatif Stres.....	13
2.5.1. İskemi/Reperfüzyonda nitrik oksit rolü .....	14
2.6. Serbest Radikaller.....	15
2.6.1. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri .....	16
2.6.1.1. Reaktif oksijen türleri .....	17
2.6.2. Serbest radikallerin üretimi .....	21
2.6.3. Endojen/Eksojen serbest radikal oluşum mekanizmaları.....	22
2.6.4. Serbest radikallerin etkileri .....	25
2.6.4.1. Hücre içi etkileri.....	25
2.6.4.1.1. Lipit peroksidasyonu .....	25
2.6.4.1.2. Karbonhidratlara etkileri.....	26
2.6.4.1.3. Proteinlere etkileri .....	26

2.6.4.1.4. Nükleik asitler üzerine etkileri .....	27
2.6.4.2. Hücre dışı etkiler .....	27
2.6.4.2.1. Kemotaksi .....	27
2.6.4.2.2. Rolling .....	27
2.6.4.2.3. Antiadhezyon molekülleri inhibisyonu .....	27
2.7. Antioksidanlar .....	28
2.7.1. Antioksidan savunma sistemleri .....	28
2.7.1.1. Doğal antioksidanlar (endojen) .....	29
2.7.1.2. Eksojen antioksidanlar .....	29
2.7.1.3. Gıda antioksidanları .....	30
2.7.1.4. Enzimatik antioksidanlar .....	30
2.7.1.4.1. Katalaz (CAT) .....	30
2.7.1.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD) .....	31
2.7.1.4.3. Glutasyon redüktaz (GR) .....	32
2.7.1.4.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) .....	32
2.7.1.4.5. Glutasyon-S-transferaz (GST) .....	33
2.7.1.5. Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri .....	34
2.7.1.5.1. Karotenoidler (B karoten) .....	34
2.7.1.5.2. Glutasyon (GSH) .....	34
2.7.1.5.3. E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol) .....	34
2.7.1.5.4. C vitamini (askorbik asit) .....	34
2.7.1.5.5. Melatonin .....	35
2.7.1.5.6. Seruloplazmin .....	35
2.7.1.5.7. Flavonoidler .....	35
2.7.1.5.8. Ürik asit (ürat) .....	36
2.8. Zerdeçal .....	37
2.8.1. Zerdeçalın kimyasal içeriği .....	38
3. MATERYAL VE METOD .....	40
3.1. Deney Hayvanları .....	40
3.2. Deney Grupları .....	40
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	40
3.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar .....	41
3.5. Kalp İskemi/Reperfüzyon Hasarı Modeli .....	42
3.6. Homojenat Hazırlama .....	45

3.7. ELISA Metodu ile GPER-1 Tayini ve Ayıraçlar.....	47
3.7.1. Kit içeriğinde bulunan ayıraçlar .....	47
3.8. ELISA Metodu ile Nitrotirozin (3-NT) Düzeyi Tayini .....	48
3.9. NO (nitrit+nitrat) Düzeyi Tayini .....	48
3.10. Protein Düzeyinin Tayini.....	50
3.11. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini.....	51
3.12. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini.....	53
3.13. Glutasyon Peroksidaz(GPx) Aktivite Tayini .....	56
3.14. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini .....	58
3.15. Histopatolojik Değerlendirme .....	59
3.16. İstatistik .....	62
4. BULGULAR .....	63
4.1. Kalp Dokusundaki SOD Aktiviteleri.....	63
4.2. Kalp Dokusundaki CAT Aktiviteleri.....	63
4.3. Kalp Dokusundaki MDA Aktiviteleri .....	64
4.4. Kalp Dokusundaki GPER-1 Aktiviteleri .....	65
4.5. Kalp Dokusundaki NO Aktiviteleri .....	66
4.6. Kalp Dokusundaki 3-NT Aktiviteleri .....	67
4.7. Kalp Dokusundaki GPx Aktiviteleri.....	68
4.8. Histopatolojik Bulgular .....	69
5. TARTIŞMA .....	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	75
7. KAYNAKLAR.....	76
8. ŞEKİLLER DİZİNİ.....	83
9. TABLOLAR DİZİNİ .....	84
10. RESİMLER DİZİNİ.....	85
11. EKLER .....	86
12. ÖZGEÇMİŞ .....	87

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>ADP</b>	: Adenozin Difosfat
<b>AMP</b>	: Adenozin Monofosfat
<b>PMNL</b>	: Polimorfonükleer Lökositler
<b>NADPH</b>	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>FAD</b>	: Flavin Adenin Dinükleotid
<b>İ/R</b>	: İskemi Reperfüzyon
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit Anyon Radikali
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>ROR</b>	: Reaktif Oksijen Radikalleri
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>OH<sup>·</sup></b>	: Hidroksil Radikali
<b>HOCl</b>	: Hipoklorik Asit
<b>HCl</b>	: Hidroklorik Asit
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	: Singlet Oksijen
<b>H<sup>·</sup></b>	: Hidrojen Radikali
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GST</b>	: Glutasyon S-transferaz
<b>GSH</b>	: Redükte Glutasyon
<b>GSSG</b>	: Okside Glutasyon
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	: Peroksinitrit
<b>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	: Nitrojen Trioksit
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>GR</b>	: Glutasyon Redüktaz
<b>SOR</b>	: Serbest Oksijen Radikalleri
<b>GP<sub>ER</sub>-1</b>	: G Protein İlişkili Östrojen Reseptör
<b>mL</b>	: Mililitre

<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik Oksit Sentaz
<b>XO</b>	: Ksantin Oksidaz
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin monofosfat
<b>CP</b>	: Keratin Fosfat
<b>ET</b>	: Endotelin
<b>ER</b>	: Östrojen Reseptörü
<b>Rho</b>	: Rhodopsin
<b>GTP</b>	: Guanin trifosfat
<b>GDP</b>	: Guanin Difosfat
<b>ROK</b>	: Rho-Kinaz
<b>ROOH</b>	: Lipit Peroksit
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>TNF</b>	: Tümör Nekroz Faktör
<b>PAF</b>	: Platelet Aktive Edici Faktör
<b>3-NT</b>	: Nitrotirozin
<b>İP</b>	: İnteraperitoneal
<b>SF</b>	: Serum Fizyolojik
<b>SOR</b>	: Serbest Oksijen Radikali
<b>ETZ</b>	: Elektron Transport Zinciri
<b>GP</b>	: Gliserol Fosfat
<b>PG</b>	: Prostaglandin
<b>kDA</b>	: Kilodalton
<b>CoA</b>	: Koenzim A
<b>LDL</b>	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<b>O.D</b>	: Optik Dansite
<b>mPTP</b>	: Sentetik bir toksin (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)
<b>KNO<sub>3</sub></b>	: Potasyum Nitrat
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	: Çinko Sülfat
<b>NANO<sub>2</sub></b>	: Sodyum Nitrit
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat

## 1) GİRİŞ VE AMAÇ

### 1.1. İskemi/Reperfüzyon

İskemi, organ veya dokulara giden kanın herhangi bir sebebe bağlı olarak belirgin olarak azalması veya tamamen kesilmesi neticesinde perfüzyonunun bozulmasıdır (1).

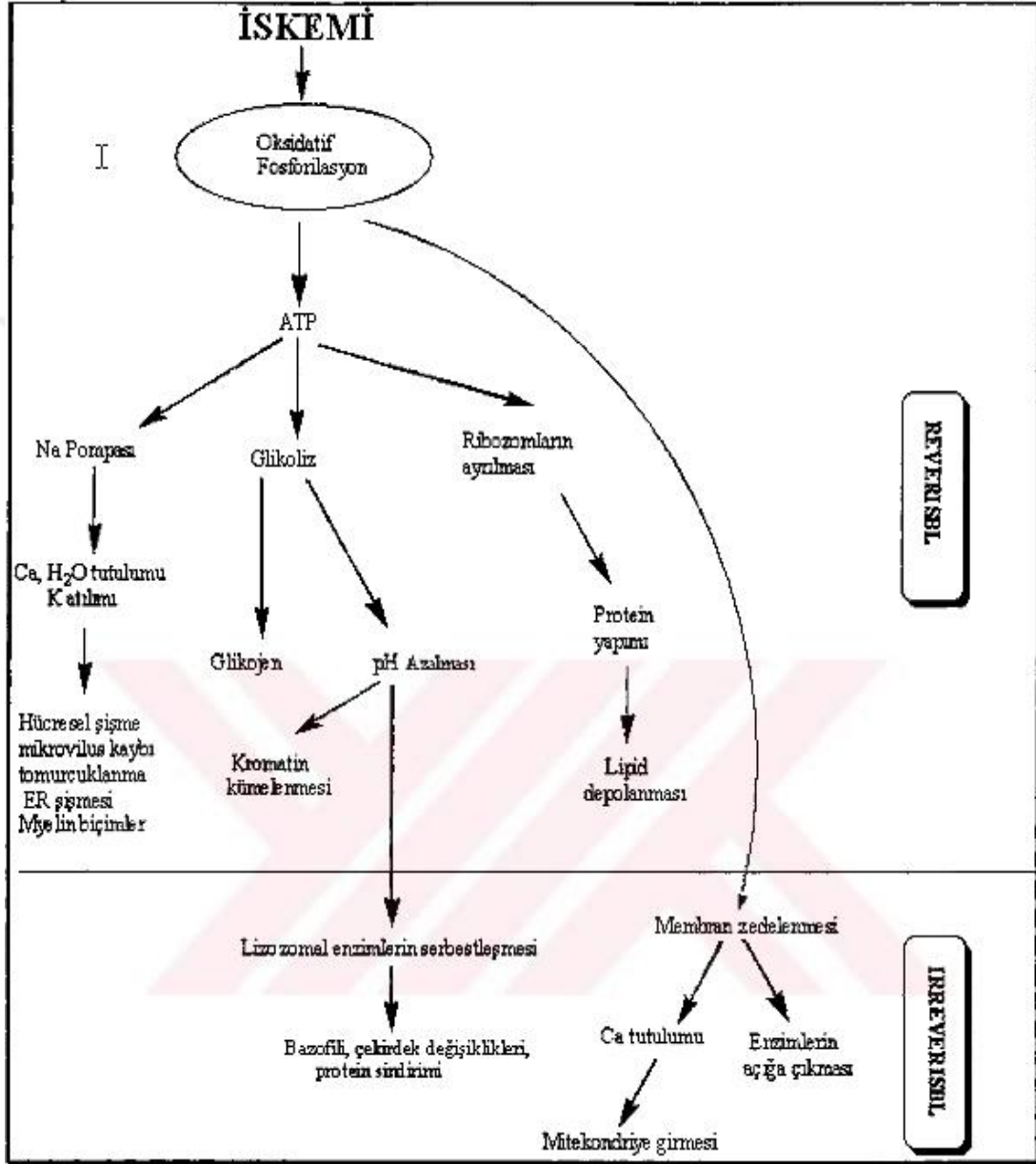
Yani iskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması durumudur (2). İskemiye maruz kalan dokunun belirli bir süre oksijensiz kalması, doku hasarı veya nekroz ile sonuçlanır. İskemi, geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku zedelenmesine sebep olabilmektedir (3).

İskemiye eşlik eden hücresel ve yapısal değişiklikler ilk önce mitokondride başlar, daha sonra hücre çekirdeği, endoplazmik retikulum, lizozom ve hücre membranı etkilenir (4). Her dokunun iskemiye dayanıklılığı birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabilmesine rağmen nöronlarda dakikalar içinde geri dönüşümsüz yıkım ortaya çıkabilir. Ayrıca iskemiye maruz kalınmayan bölgelerde de hasar oluşabilir. Kan akımının kesildiği bölgede lokal doku hasarı, bu alan dışındaki bölgelerde ise uzak organ hasarı oluşabilir (5, 6).

Reperfüzyon, iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden sağlanması durumudur (7). Reperfüzyon ile iskemik dokuda enerji ihtiyacı karşılanır ve toksik metabolitler uzaklaştırılır. Yani reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için şart bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü ve reaktif oksijen radikalleri, dokuya daha fazla zarar veren bir reaksiyon sürecini başlatır. Dokuda İ/R sonucu meydana gelen hasar, dokunun aynı toplam sürede sadece iskemiye maruz kalması sonucu oluşan hasardan daha fazladır (2, 5) (Şekil 1).

İ/R'de oluşan hasardan başlıca sorumlu olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu genel olarak ksantin oksidaz aracılı, mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ), nitrik oksit sentaz ve fagositik hücre aracılı olmak üzere birbirleriyle bağlantılı 4 ana biyokimyasal mekanizmayla açıklanmaktadır (8, 9). Oluşan doku hasarının şiddeti, iskeminin süresi dışında doku ve organların yapısal ve biyokimyasal metabolizmaları açısından spesifik farklılıkları ile de ilişkilidir (10). Reaktif oksijen radikalleri (ROR)'nin potansiyel hasarlarına karşılık çok sayıda hücre koruyucu enzimler ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasar sınırlandırılmaya çalışılır. Vücuttaki hücresel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki bir denge halindedir (11, 12). Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak

için hızlı ve spesifik (enzimatik) bir şekilde çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkin olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar ise süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerdir (12, 13).



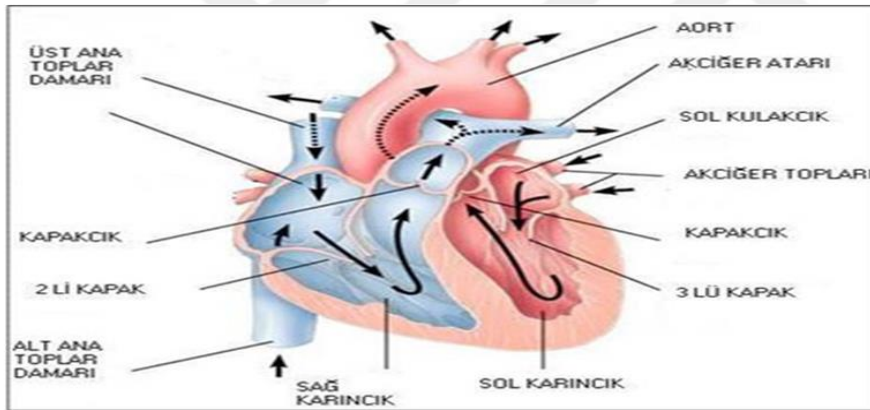
Şekil 1: İskemik hasarda oluşan reaksiyonlar (14)



## 2. GENEL BİLGİLER

Kalp, vücutta kan dolaşımını sağlayan bir organdır. Görevi pompa olarak damarların içinde kanın dolaşımını sağlamaktadır. Kalp bu işlemi, kasılıp gevşeyerek gerekli basınçta oluşturarak gerçekleştirir. Kalp, iki pompadan oluşur. Kalbin sağ tarafı vücuttan gelen kirli kanı pulmoner dolaşıma pompalar, böylece kandaki karbondioksit akciğerlerdeki oksijenle yer değiştirip kalbin sol tarafına döner. Kalbin sol tarafı ise kanı sistematik dolaşıma pompalar, sonuç olarak da kanın tüm dokulara sonrasında tekrardan kalbe ulaşması sağlanır. Yetişkin sağlıklı bir kalp ortalama yumruk büyüklüğünde ve koni şeklindedir. Yetişkin erkeklerde ağırlığı 280-340 g arasında, yetişkin kadınlarda ise 230-280 g arasındadır.

Ömrün ilerlemesiyle beraber, kalbin hacminde ve ağırlığında artış olabilmektedir. Ayrıca sağlıklı bir kalbin hacmi, yaşa, cinsiyete ve kişiye göre az da olsa farklılık göstermektedir. Sağlıklı kalbin kapasitesinin 500-700 cm<sup>3</sup> arasında olduğu bilinmektedir (15) (Şekil 2).



Şekil 2: Kalbin yapısı (16)

### 2.1. Kalbin Yapısı ve Temel Fonksiyonları

Embriyonel dönemde kalp ve dolaşım sistemini oluşturan kan damarları, kan hücreleriyle birlikte kardiyovasküler sistem mezoderm tabakasından oluşur. Perikardiyal kese, kalbin çevresini saran çift tabakalı, kapalı kese halinde zarsı yapıdır. İç ve dış kısım olarak iki tabakadan meydana gelir. Kalp duvarı; epikardiyum, merikardiyum ve endokardiyum olarak üç tabakadan oluşur. Kalp kapakları ise bağ doku ile çift tabakalı olan endokardiyal kıvrımdan oluşur. İnsan kalbi iki atrium ve iki ventrikülden meydana gelir. Kan, yüksek basınçlı sistematik dolaşımdan daha düşük basınçlı olan sağ atriyumda doğru akarak vücuttaki dolaşım görevini yerine getirdikten sonra sağ atriyumdan kalbe gelir. Sağ atriumdaki önemli orandaki

kan, gevşemiş olan sağ ventriküle doğrudan gelir. Sağ atriumdaki az miktarda olan kan, sağ ventriküle gelerek sağ ventrikülün doldurulmasını sağlar. Sağ ventrikülün kasılmasıyla kan, karbondioksitin verilip oksijenin alındığı akciğerlere iletmeyi sağlayan pulmoner arterlere taşınır. Dört pulmoner ven vasıtasıyla kan akciğerlerden sol atriuma geçmektedir. Sol atrium kasılır, biküspid kapağı açılır ve kan sol ventriküle gelir. Sol ventrikülün kasılması, kanı biküspid kapağa doğru gönderir ve kapatır, ayrıca aort kapağı açılır ve böylece kanın aorta geçişi sağlanır. Artık aortta olan kan, pulmoner kan damarları sayesinde akciğerin beslenen kısmının dışında vücudun her tarafına gönderilir (15).

## **2.2. Kalpte İskemi/Reperfüzyon Hasarı**

Dokunun metabolik ihtiyaçlarını gidermek için arteriyel akımla yeterli oksijen ve besinin tamamlanamadığı durumlarda iskemiden bahsedilir. İskemi, doku hasarına sebep olduğundan dolayı önemlidir. Meydana gelen hasarın miktarında, iskeminin ciddiyeti de süresi de önemli faktördür. Oluşan iskemide süre 40 dk. dan azsa hücrel ve fonksiyonel farklılıklar geri dönüşümlüdür ve tedavi imkanı vardır. Bu süre, 40–50 dk. ise tam bir işlev kaybı, iskemi süresine bağlı olan ilerleyici geri dönüşümsüz bir hasar oluşmaktadır. Bu iskemi süresi 50 dk. dan fazla ise reoksijenasyon veya reperfüzyon hasarına benzerlik gösteren, fakat aynı olmayan tepkimeler devreye girer.

İskemik doku en az üç fizyolojik anormal durum gösterir:

- a) Hipoksi; oksidatif metabolizma için yetersiz oksijen varlığı,
- b) Aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya dönüşü belirten toksik metabolitlerin birikmesi,
- c) Uygun elektron akseptörünün olmaması durumunda katabolik reaksiyonların sonunda oluşan asidoz. Deneysel şartlarda, ana koroner arterin aniden kapatılmasıyla meydana gelen iskemideki metabolik farklılıklar; aerobik metabolizmanın durmuş olması, kreatin fosfatın (CP) eksilmesi, anaerobik glikolizin başlaması, laktat ve alfa gliserol fosfat (GP) gibi glikolitik ürünlerle nükleotid yıkım ürünlerinin birikmesiyledir. Bunlarla ilişkili olan kontraksiyon durur, membran potansiyelleri değişir ve elektrokardiyografik farklılıklar oluşur (17).

## 2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Herhangi bir organa gelen kan akımının farklı sebeplerle (özellikle de vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu sırasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. İskemi uzun sürerse hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücre ölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokunun tekrar kanlanmaya başlamasıdır. Reperfüzyonda, özellikle dokuya yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salgılanan serbest oksijen radikalleri (SOR) dokudaki yıkımı artırır. Bu döngüye de reperfüzyona bağlı doku hasarı denilmektedir (18).

İskeminin sonucunda hipoksi oluşur, oluşan hipoksi ise aerobik oksidatif solunumu etkiler ve son derece önemli olan bir hücre zedelenmesi ve ölüm nedenidir (18). İskemi uzun süre devam ederse enerji eksikliğinden dolayı şu döngüler oluşur: İskeminin sonucunda oksijenin azalması, Krebs döngüsü ile aerobik oksidasyonda azalmaya ve hücredeki adenosin trifosfat (ATP) miktarında düşüş meydana gelir. Bu durum ise adenosin difosfat (ADP) ile fosfat birikimi ve Embden-Meyerhoff yolundaki anaerobik likolizde artış ile sonuçlanır. Laktik asit ile pürivik asit birikir ve laktat artışı ile H<sup>+</sup> birikimi doku pH'ında düşüğe sebep olur. Laktik asit ve düşük pH; proteinin parçalanması, enzim işlevlerinde kayıp, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) rejenerasyonunun engellenmesi ve serbest radikal oluşumu gibi iskemik hasar meydana getiren etkenlerin gelişimini artırır (19).

### 2.3.1. İskemi/Reperfüzyon hasarının mekanizması

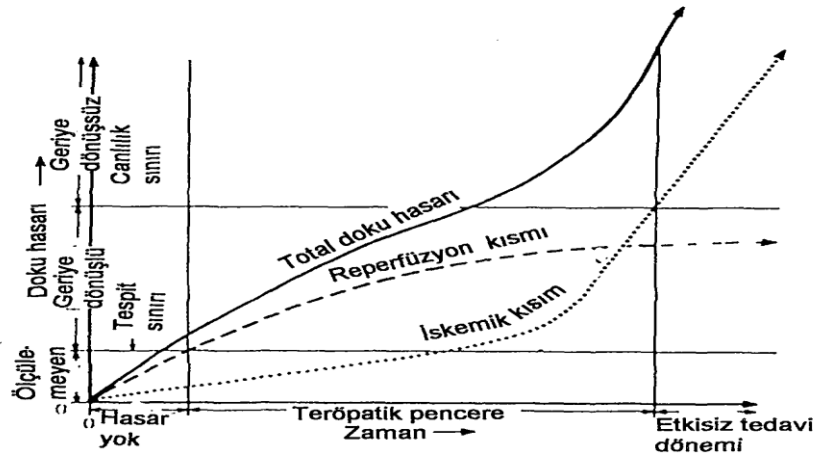
İskemi ve reperfüzyon esnasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca<sup>+2</sup> artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına neden olan proteaz ve fosfatazların aktifleşmesi sonucunda aşırı miktarda SOR oluşarak, oksidatif strese neden olmaktadır (20, 21). İ/R hasarının fizyopatolojisinde, SOR'un önemli rol oynadığı belirtilmektedir (20, 22). Serbest radikaller, canlı organizmaların yapılarındaki birçok biyomoleküller ile reaksiyona girerek onlar üzerinde geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz etkiler oluşturabilmektedirler (21, 14). İskemi esnasında küçük oranda serbest radikal meydana gelmekteyse de, reperfüzyon sırasında dokunun yeniden oksijenlenmesinden sonra çok daha büyük miktarda serbest radikal oluşur ve bunlar da lipid peroksidasyonuna neden olarak hasarı artırmaktadırlar (23) (Şekil 3).

Mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun engellenmesine sebep olan hipoksi, hayati öneme sahip olan ATP yapımını durdurur. Kritik noktadan sonra ise öldürücü membran zedelenmesine yol açar.

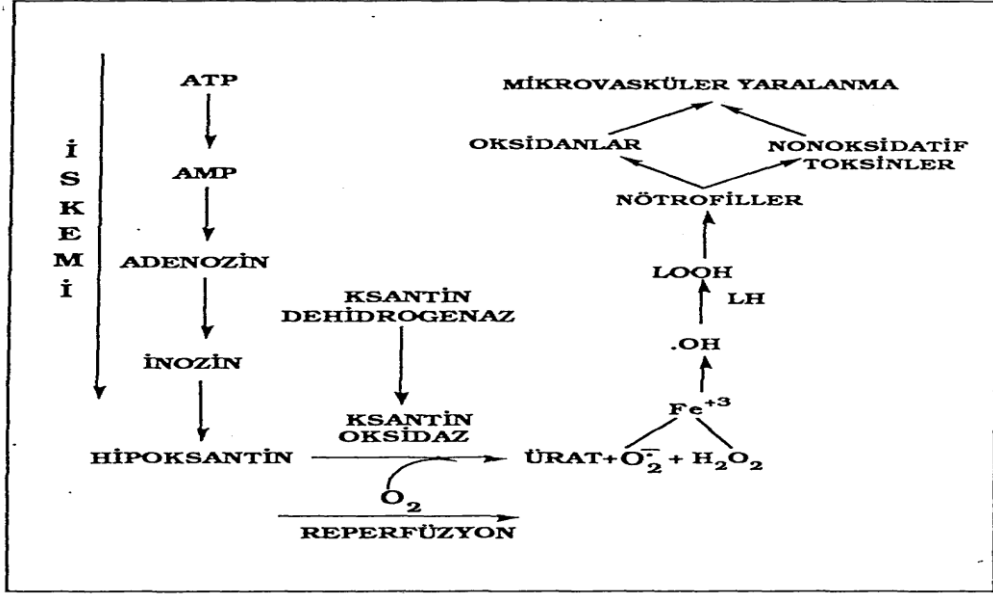
Aynı zamanda meydana gelen reperfüzyonda hücrede şu hasarlara sebep olmaktadır:

1. Ksantin oksidaz kaynaklı serbest radikallerin yapımı (Şekil 4)
2. Hasarlı endotele nötrofil yapışması durumunda artış
3. Enerji kaybı olan organa reperfüzyon esnasında  $Ca^{+2}$  taşınması
4. Post iskemik dönemde adenin nükleotit sağlanmasındaki yetersizlik, hücredeki enerji açığı.

İskemide ATP; ADP, AMP, inozin ve hipoksantine yıkılmaktadır. Normal durumda hipoksantin ksantinoksidaz ile ksantin ve ürik aside okside olur. Bu birikim hipoksantin oksijenizasyonu için substrat fazlalığı oluşturmaktadır. Reperfüzyonda ani olarak ve fazla miktarda  $O_2$  sağlandığından, hipoksantin ksantine oksidasyonu, süperoksit radikallerinin meydana çıkmasına neden olmaktadır (24).



Şekil 3: İskemi/Reperfüzyon hasarının mekanizması (14)



Şekil 4: Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması (14)

Reperfüzyon dönemindeki hüresel asit/baz dengesindeki değişiklikler ve tekrardan oksijenlenmenin, hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu arttırdığı bilinmektedir. İskemik aşamadaki düşük pH seviyelerinin, dokuyu iskemik hasardan koruduğu kalp gibi birçok organda belirtilmiştir. İskemi sonucunda ATP düzeylerinin azalması, endoplazmik retikulum ve mitokondrinin ATP bağımlı  $Ca^{+2}$ 'nin sitozolik regülasyonunu oluşturmaya engel olur. İ/R döneminde, sitoplazmik  $Ca^{+2}$  regülasyonunun sağlanamaması ve hasarlı membranlarda  $Ca^{+2}$  geçirgenliğinin artması, fazla  $Ca^{+2}$  yüküne maruz kalan mitokondrilerde, oksidatif fosforilasyon işlevinin bozulmasına sebep olur. Mitokondrial solunum yapılamaz ve artan  $Ca^{+2}$  miktarıyla işlev bozukluğu doğru orantılıdır (25).

### 2.3.2. Endotel hücresinin rolü

İ/R hasarının oluşumunda endotel hücreleri önemli bir role sahiptir. Oksidatif stres, endotel hücrelerin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına sebep olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumunda iken diğer bir taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretmektedir. NO arteriyel dolaşımında ET'nin vazokonstriktör etkinliğini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tam tersi söz konusudur. İ/R hasarında ET/NO oranı ET lehinde bozulur. Sonuçta ise arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur (26). Endotel hücrelerin oksidatif stresi sonucunda kompleman aktive olur ve lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisiyle endotel hücreleri hasara cevap olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I<sub>2</sub>,

PG E<sub>2</sub>), GM-CSF, büyüme faktörleri, ET, NO ve tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) salgılar. Aktive olan endotel hücreleri ilaveten kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedirler (27).

NO'nun radikal açıdan reaktivitesi düşüktür, fakat metal içeren bileşikler ve radikallerle büyük bir hızla reaksiyona girerler. Özellikle lipit radikaller ile reaksiyona girmesi NO'ya antioksidan etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, asıl olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO<sup>-3</sup>) oksitlenerek etkinliği sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun tersine, NO'yu ortamdan temizleyen özel bir enzim yoktur. İndüklenebilir NO sentaz enziminin indüksiyonu esnasında NO derişiminin artmasıyla oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli olan reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'nun dolaylı etkilerinden sorumludurlar ve hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna neden olarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına yol açabilirler (28).

### **2.3.3. Nötrofillerin rolü**

Reperfüzyon hasarına engel olmaya yönelik antinötrofil serumlarla veya lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikolar ile yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir (29).

Bilindiği üzere nötrofiller fagositoz ile canlıyı enfeksiyöz ajanlara karşı koruyan kan hücreleridir. Yapılan araştırmalarda, iskemik hücrelerin kemoatraktan maddeleri ve adhezyon moleküllerini salgılayıp, nötrofil ve trombositlerin vasküler endotele adhezyonuna ve dolayısıyla da inflamatuvar yanıtı neden olduğu gösterilmiştir (30, 31).

İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir (32). Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir. İ/R hasarında PMNL'nin rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (33). Bunlar:

- 1) Mikrovasküler oklüzyon
- 2) SOR salınması
- 3) Sitotoksik enzim salınması
- 4) Vasküler permeabilite artışı ve
- 5) Sitokin salınmasında artıştır.

Aktif nötrofiller saldıkları maddelerle neden oldukları hasarın yanı sıra, damar içinde meydana getirdikleri hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da yol açarlar (34). Son çalışmalarda;

nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Programlı hücre ölümü olarak da bilinen apoptozisin oluşması, normalde immün sisteminin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bileşenidir (35). Hücrel ölüm yolağındaki düzensizlikler, İ/R hasarından ziyade, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da neden olabilmektedir (36).

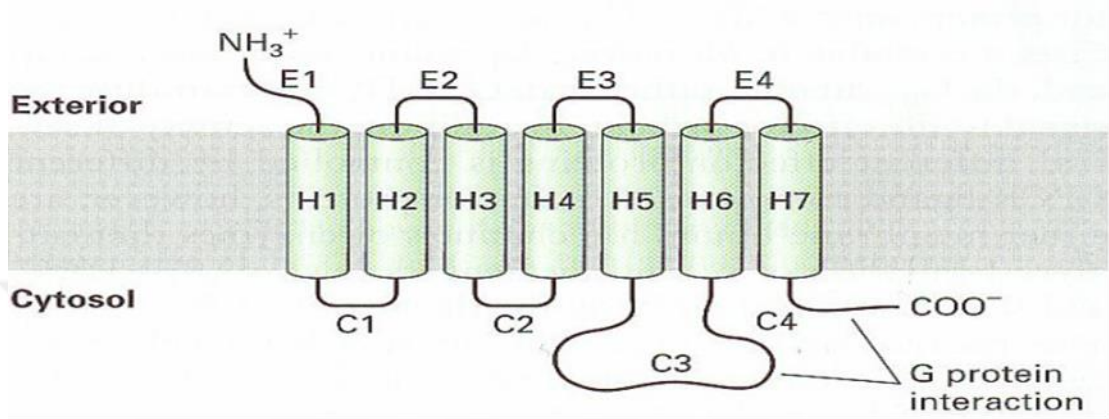
Dokuda aktive lökositlerin başlattıkları yanıt şu mekanizmalarla oluşturulur (37, 38). Fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) sonucunda üretilirler. Degranülasyon sonucunda lizozomal enzimler ortama verilir, SOR üretimi oluşur. Bu ürünler endotel hasarının ve doku zedelenmesinin güçlü olan araçlarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkinliğini güçlendirirler. Bazı durumlarda ise lizozomal enzimler hücrenin dışına salınabilirler. Hasar oluşturucu etkeni yok etmeye veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucunda, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de meydana gelmektedir. İşlevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümü gerçekleştirirler ve makrofajlar vasıtası ile lenfatik dolaşım yoluyla ortamdan uzaklaştırılırlar (36, 39).

Serbest radikallerin oluşmasında ve İ/R hasarında önemli kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini içerir. Bu enzimlerin oksidan doku hasarında önemli rolleri vardır ve aktive nötrofillerde ksantinoksidazın artmasıyla SOR'un salınımı "solunum patlaması" nı açığa çıkarır. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerinden salınan apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kollajenaz, jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasar oluşturmaktadır. Proteinazların etkisiyle damar duvarının yapısının değişimi ve duvar yapısının gevşemesiyle nötrofillerin dokuya olan göçü kolaylaşmaktadır (36, 40).

#### **2.4. GPER-1**

G proteini ile ilişkili reseptör, 30 G proteini ile ilişkili östrojen reseptör 1 (GPER-1) olarak adlandırılır. Yedi transmembranel domainli G proteini ile ilişkili reseptöre (GPCR) 17 β estradiol'ün yüksek afinite ile bağlandığı ve östrojenik sinyallere aracılık ettiği bilinmektedir (Şekil 5). G protein-coupled östrojen reseptör 1 (GPER-1), G protein-coupled reseptör 30 (GPR30) olarak da bilinmektedir ki, insanlarda GPER geni tarafından kod edilen G protein-coupled reseptördür. GPER-1 rodopsin benzeri familyasının üyesidir ve endoplazmik retikulumda lokalize olmuş multipass membran proteindir. GPER-1 nükleusta

fosfotidilinositol 3, 4, 5 trifosfat üretimine ve intraselüler kalsiyumun mobilizasyonuna sebep olup sonunda östrojeni bağlar. Bu nedenden dolayı GPER-1, yaygın olarak östrojen ile hücre ve dokuların uyarılmasını takiben gözlemlenen non-genomik sinyal olaylarında görev alır (Şekil 6). GPER-1,  $G_{os}$  ile bağlanıp siklik adozin monofosfat (cAMP) sitmülasyonuna, melanosit duyarlı  $G_{oi}$  ile bağlanıp cAMP üretimin azalmasına sebep olur (41).



Şekil 5: G proteini yapısı (41)

#### 2.4.1. G protein kenetli reseptörler (GPER-1)

Sinyal iletim sisteminde rol oynayan G proteinleri Martin Rodbell'in laboratuvarında 1960 yılında glukagon bağlanma deneyleri esnasında bulunmuştur. Guanin nükleotid bağlamaları sebebiyle G proteinlerine bu ad verilmiştir. Adenilat siklaz enziminin aktivitesi araştırılırken G proteinin ATP'den daha fazla rol oynadığı anlaşılmış ve G protein üzerine yapılan araştırmalar hızlanmıştır. Yapılan çalışmalarda  $Mg^{+2}$  iyonunun G proteininin aktivitesini artırdığı ispatlanmıştır (42).

Reseptörlerden hücre içindeki efektör enzimlere sinyal iletimini sağlayan G proteinleri  $GTP^-$  bağlayan bir  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  alt birimlerinden meydana gelmektedir.  $\beta$  ve  $\gamma$  alt birimleri  $\beta\gamma$  dimeri durumunda kompleks haldedirler. Üç alt birimde fenilasyon mekanizması ile üzerlerindeki bir amino asiti yan zincire bağlanmış bir yağ asitiyle membrana tutunurlar. G proteinlerinin membranın iç yüzeyinde serbest olarak difüze olduğu düşünülmektedir. Bu öngörülerde hücrenin içinde olan bir G protein popülasyonunun birden çok reseptör ve efektör ile fazla seçici olmayan bir reaksiyona girebileceği öneren anahtar özelliği durumundadır (43). GPER-1 ile ilgili aynı zamanda şu bulgulara da rastlanmıştır.

GPER-1; cinsel hormonların, özellikle de östrojenlerin, yaygın anksiyete bozukluğunun (GAD) fizyopatolojisinde görev aldığı düşünülmektedir. GPER-1 düzeylerinin



hastaların anksiyete seviyeleriyle bağlantılı olduğu ve serum GPER-1 seviyesinin, cinsiyetten bağımsız olan anksiyete varlığının öngörücüsü olduğu belirtilmiştir (44).

GPER-1 agonisti G-1'in A549 insan akciğer kanseri hücreleri üzerinde bulunan antikanser etkinliklerini incelemeyi hedefleyen bir çalışmanın sonucu, G-1'in hücre proliferasyonunu önemli seviyede azalttığı açığa çıkarılmıştır (45).

Kalp, Esr1, Esr2 ve G proteinine bağlı olan östrojen reseptörü 1 (GPER-1) 'de üç tip östrojen reseptörü (ER) vardır. Östrojen ile GPER-1 bağlanmasının, PKC translokasyonu, ERP1/2/GSK-3 $\beta$  fosforilasyonun ve mPTP açılmasının önlenmesine neden olan bir kaskad yolu ile, erkek farede oluşan İ/R hasarına karşı kardiyoprotektumda önemli bir işlevi olduğu belirtilmiştir (46).

Yapılan başka bir çalışmada ise yeni bir östrojen reseptörünün, G proteine bağlı eritrojen reseptör 1'in (GPER-1/GPR30) nöroprotektif etkinliğinin analiz edilmesi neticesinde gerçek zamanlı niceliksel RT-PCR, G1 tedavisinin, küçük iletkenliğe sahip olan kalsiyumla aktive edilmiş potasyum kanalı 2 nöroprotektif iyon kanalı ekspresyonunu artırdığı belirtilmiştir. GPR30 agonistlerinin küresel serebral iskemiye takiben beyin hasarını azaltmayı vaat ettiği açığa çıkarılmıştır (47).

Sinyal iletiminden sorumlu olan G proteinleri iki sınıfa ayrılır.

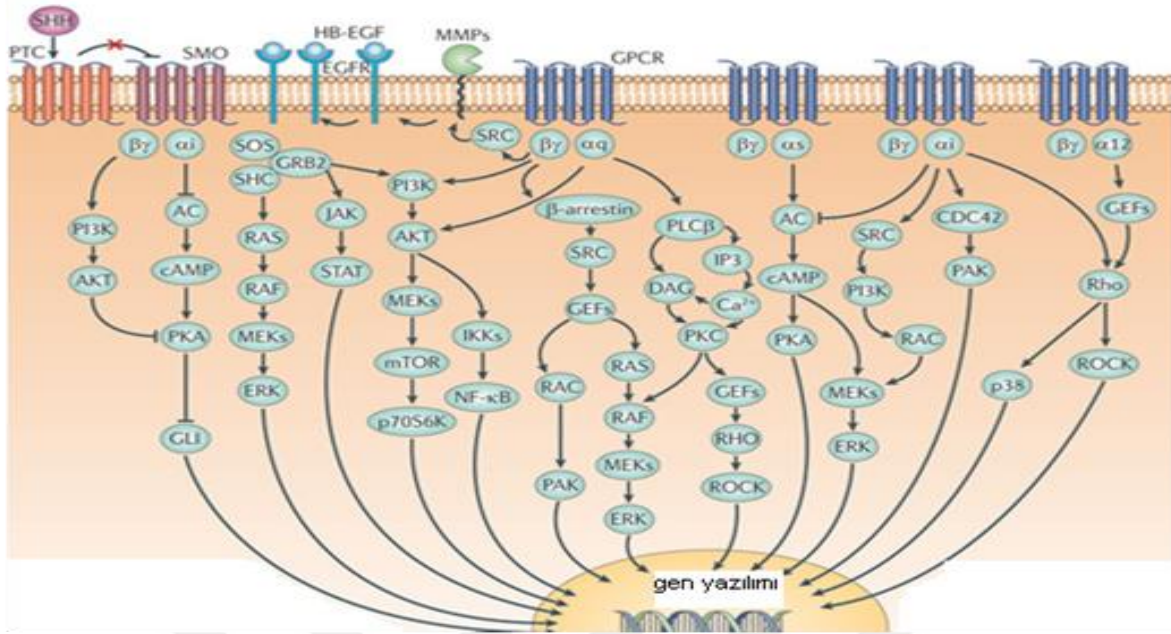
1. Heterotrimerik G Proteinleri
2. Tek bir  $\alpha$  subunit içeren küçük G proteinleri (48)

#### 2.4.1.1. Heterotrimerik G proteinleri

Hücre membranından hücre içine sinyal iletiminden sorumlu olan moleküllerdir. Hücre membran reseptörü bir agonist ile etrafı sarıldığında, reseptör aktivitesinde farklılıklar meydana gelir. Burada üretilen sinyaller ilgili G proteinini aktive ederler. Sonra efektör etkin hale gelir. G proteini bağlantılı olan sinyal iletim sistemi sinyalin amplifikasyonunu içerir (48).

#### 2.4.1.2. Küçük G proteinleri

Küçük Guanin nükleotidini bağlayan proteinler molekül ağırlıkları yaklaşık 20-40 kDA olan monomerik G proteinleri olarak isimlendirilirler ve 100'den fazla familyası vardır. Fakat yapısal olarak sırasıyla Ras, Rho/Rac/Cdc 42, Rab, Sar1/Arf, Ran olmak üzere 5 familyaya ayrılır (49-52).

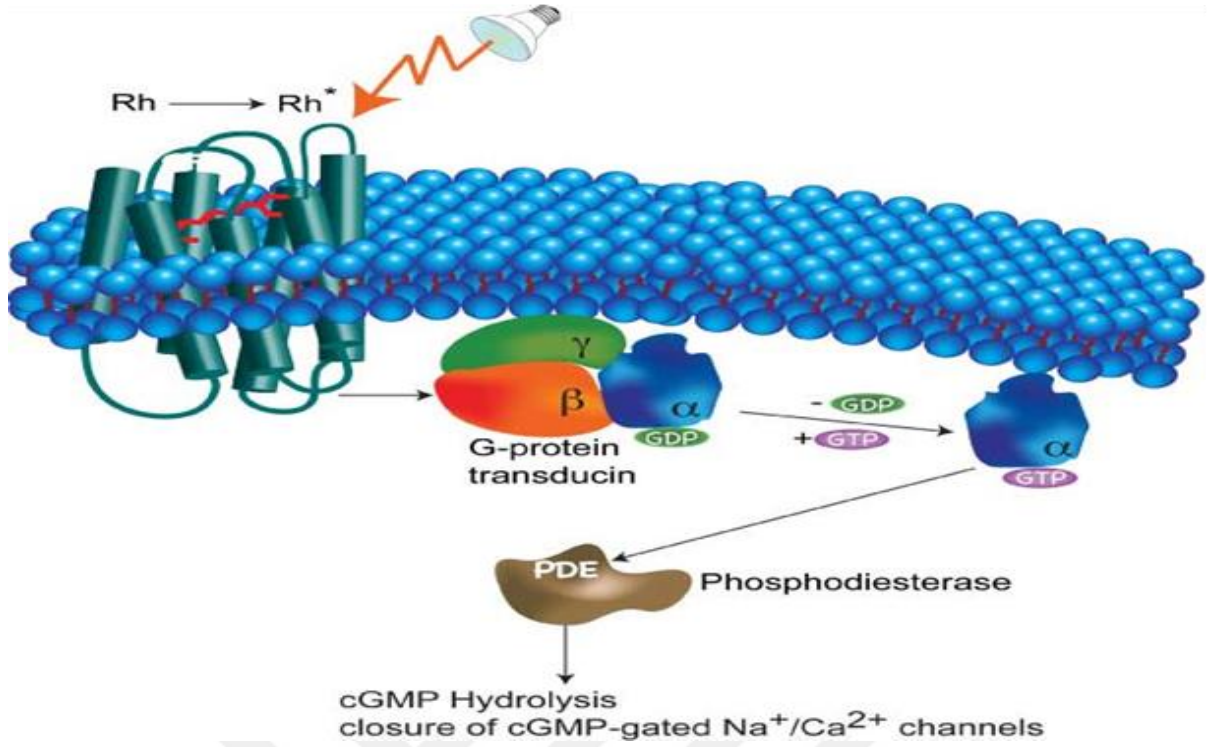


Şekil 6: G proteini hedefleri (41)

GPER-1 ilk kez 1996 yılında klonlanmış ve ona ilk başta GPR-30 adı verilmiştir. 2007 yılında yapılan çalışmalarda insan arter ve ven düz kaslarında GPR-30 ekspresyonu gösterilmiştir. GPER-1'in, plazma zarı ve endoplazmik retikulumda lokalize olduğu ve insan vücudunda kalp, kemik, lenfoid doku, beyin, plasenta, karaciğer, akciğer, pankreas, kan damarları, endometrium, over ve meme kanseri dokularında eksprese edildiği belirtilmiştir (41).

#### 2.4.1.2.1. Rho

1985 yılında Aplysia'dan bir Ras homoloğu olarak klonlanmış olan Rho geni kısa sürede üç insan homoloğu RhoA, RhoB, RhoC olarak bulunmuştur (52). RhoA, Ras süper familyasının küçük G proteindir. Aktif bir GTP bağlı formuyla inaktif GDP bağlı formu arasında değişmektedir (Şekil 7). RhoA'nın hücresel görevleri; proliferasyon, farklılaşma ve gen regülasyonu gibidir (53).



**Şekil 7:** Rodopsin yapısı (41)

#### 2.4.1.2.2. Rho/Rho-kinaz yolağı

Rho-kinazın ROK $\alpha$  ve ROK $\beta$  iki önemli yolağı vardır. Rho-kinazlar serin/treonin protein kinazlarıdır. Amino-terminal katalitik kinaz bölgesi, Rho-GTP bağlanmış bir kıvrık sarmal bölgesi ve sisteinden zengin bir parça ile ayrılmış C-terminal plekstrin homoloji bölgesi içermektedirler (54).

### 2.5. Oksidatif/Nitrozatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşma hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı denge halindedir ve bu durum "oksidatif denge" olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı müddetçe organizma, serbest radikallerden etkilenmez. Radikallerin oluşma hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşüş, bu dengenin bozulmasına yol açar. Serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki bu ciddi dengesizliğe ise "oksidatif stres" denir. Serbest radikaller çeşitli makro moleküllerle tepkimeye girerek çok farklı ürünler oluşturup hasara yol açarlar (55).

Genel olarak nitrozatif stres artışı oksidatif stres artışı ile bağlantılıdır. Nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi ve nitrik oksit ( $\bullet$ NO) üretimindeki farklılıklar kalbi etkiler (56).

Aerobik (oksijenli solunum yapan) organizmalarda serbest radikal oluşumlarını kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlarına engel olmak için antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Fakat bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkilerini tamamen engelleyemez ve oksidatif stresi meydana gelir. Bu duruma vücudun paslanması da denilir. Oksidatif stres ile beraber oluşan ve ROT/metabolitleri olarak bilinen moleküller özellikle lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine hasar verir. Oksidatif stresin proteinlerde yol açtığı oksidasyon sonrası peroksitler ve protein karbonilleri oluşur (57).

Oksidatif stres durumunun ölçülmesi, düzeltme ve onarımı yapan kompleks endojen savunma sistemlerin olması nedeniyle zordur. Antioksidan miktarlarındaki azalma veya onların metabolitlerdeki artışın değerlendirilmesi ile oksidatif stres durumu ölçülebilir. Oksidatif stres, genel olarak lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA; oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-hidroksi-2'deoksiguanozin (8-OHdG); protein oksidasyonu; SOD, GPx, CAT, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler; alfa-tokoferol, askorbik asit, glutatyon, ubikinon, sistein gibi antioksidanların ölçülmesiyle belirlenir (58).

### **2.5.1. İskemi/Reperfüzyonda nitrik oksitin rolü**

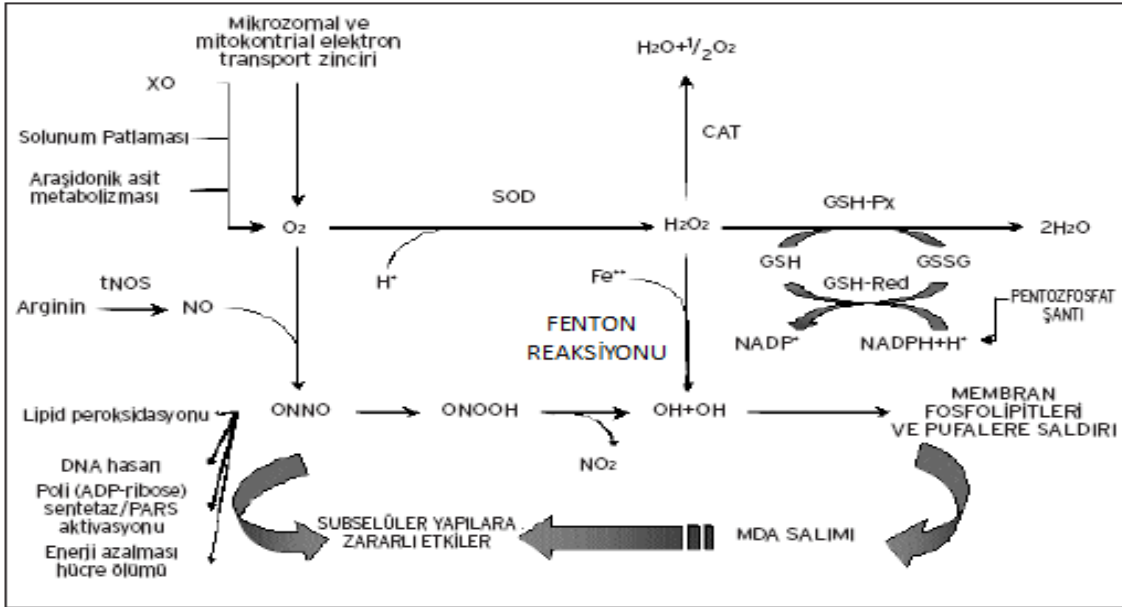
NO• oldukça reaktif bir serbest radikaldir. Yarı ömrü sadece bir kaç saniyedir ve süperoksit gibi serbest radikallerle kolayca birleşir. Biyolojik sistemlerde hızla nitrit ve nitrate parçalanır (8, 9). NO'nun, süperoksit radikali (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) ile in vivo reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) proteinlerdeki tirozin kalıntılarını nitratlayarak nitrotirozin (NT) yapısını oluşturur (59).

NO•, reaktif bir radikal olup başlıca nitrik oksit sentaz (NOS) ailesinin endotelial (eNOS), indüklenebilir (iNOS) ve nöronal (nNOS) izoformlarınca üretilir. Oldukça kompleks etki mekanizmasına sahip olan NO'nun bu etkileri, sentezlenme hızı ve miktarına göre farklılık gösterir. Bu durum ise İ/R hasarında nitroaktif stres olarak önemli derecede rol oynar. Dokularda normal durumda NO•, oksijenin varlığında argininin sitriline oksidasyonu ile üretilir, kofaktör olarak ise tetrahidrobiopterin kullanılır. Normal fizyolojik koşullarda ise eNOS tarafından endotelial hücrelerde gayet az miktarda sentezlenir ve vazodilatasyon, düz kaslarda relaksasyon, lökosit adhezyonunu önleyici, trombosit fonksiyonları ve hücre içi sinyal iletiminde düzenleyici olarak rol alır. İ/R'de ise süperoksit radikallerinin üretimi artar. Artan süperoksit, ortamda endojen olarak bulunan NO• ile tepkimeye girerek oldukça reaktif ve potansiyel olarak toksik peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) ve nitrojen trioksit (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) üretimine neden

olur. Aynı zamanda endojen üretilen NO• miktarının azalmasına neden olduğundan, NO•'in koruyucu etkilerini önler ve oksidatif strese katkı sağlar. Ortamdaki NO• ile arginin ve/veya tetrahydrobiopterin kofaktörünün eksilmesi de “eNOS-uncoupling” olarak adlandırılır ve NOS'un süperoksit sentezine yönelmesini tetikleyerek ROT üretimini artırır.

Nitrik oksit sentaz yoluyla; normal fizyolojik koşullarda ve yeterli miktardaki substrat varlığında NO• üretilir. İ/R'de ise artan süperoksit sentezi NO ile beraber peroksinitrit sentezine neden olur (60).

Lökositlerdeki solunum patlaması ROT'ların oluşumu için önemli kaynaklardan biridir. Aşırı lökosit aktivasyonu ROT oluşumunu arttırarak doku hasarına yol açabilir (59) (Şekil 8).



Şekil 8: Serbest radikal oluşumu, antioksidan metabolizma ve lipid peroksidasyonu (16)

## 2.6. Serbest Radikaller

Önceden iskemik duruma gelmiş fakat ölmemiş hücredeki kan akımı tekrar sağlandığında zedelenme düzeleceğine daha fazla artar (Şekil 9). Sonuçta dokular iskemik hasar neticesinde irreversibl olarak yok olmaya devam eder. Buna İ/R zedelenmesi denir ve bu doku için çok önemlidir (18, 40).

Serbest radikallerin oluşmasından sonra yeni hasar oluşur. Bu hasar ise oksijenin tekrar kullanılmasıyla ya da o bölgeye gelen inflamatuvar hücrelerden kaynaklanır. Reaktif oksijen ürünleri, mitokondrial permeabilite değişimini ilerletebilir. Bu hücreler de antioksidan mekanizmaların etkisindedir (18, 61).

Serbest radikaller üç şekilde üretilir (40):

1. Bir molekülün kovalent bir bağının her yerinde ortaklanmamış bir elektron bulunacak şekilde homolitik parçalanması

2. Bir molekülün tek elektronunu kaybetmesi

3. Bir moleküle tek elektron eklenmesi

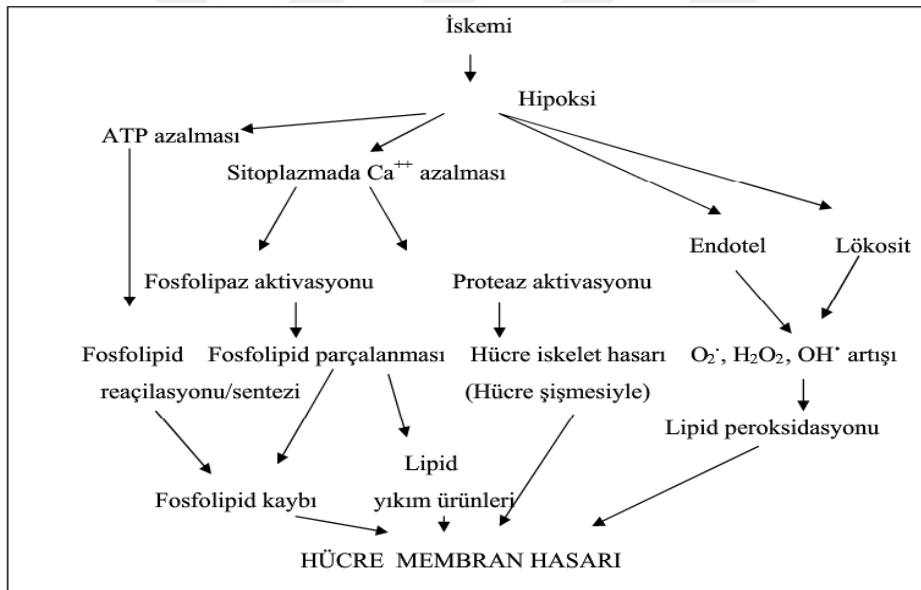
Serbest radikaller pozitif yüklü ya da nötral olabilirler (62).

Elektron transferi ile radikal üretimi:  $A + e^- \rightarrow A^-$

Homolitik füzyon ile radikal üretimi:  $X : Y \rightarrow X^\cdot + Y^\cdot$

Heterolitik füzyon ile radikal üretimi:  $X : Y \rightarrow X^- + Y^+$

Biyolojik sistemlerde elektron transferiyle radikal oluşması homolitik füzyondan daha da yaygındır. Homolitik füzyon; ultraviyole ışığı, yüksek sıcaklık ya da iyonize radyasyondan oluşacak enerjiye ihtiyaç duyar. Heterolitik füzyonda ise serbest radikaller oluşmaz ve ürün olarak sadece yüklü gruplar oluşur (63).



Şekil 9: İskemi sürecinde membran hasarı (14)

### 2.6.1. Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri

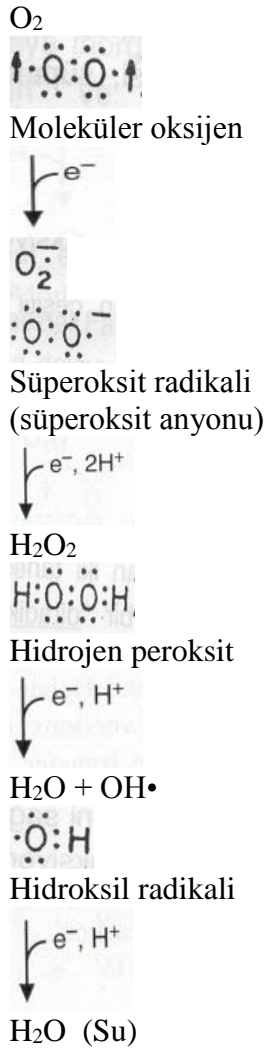
Serbest radikaller, bir ya da daha çok ortaklanmamış elektron bulunduran atom ya da moleküllerdir. Orbitali doldurup stabil duruma gelmesi için başka bir elektrona ihtiyacı olduğundan ortaklanmamış elektronlar serbest radikalleri oldukça reaktif yapar. Bu bileşikler organizmada metabolik yolların işlev süreci esnasında meydana geldiği gibi, farklı dış

etkenlerin etkisiyle de üretilir. Ömürleri çok kısa olmasına rağmen, yapılarındaki dengesizlikten dolayı çok aktif yapıda olan serbest radikaller hücre bileşenlerinin tümüyle etkileşme özelliğindedir. Aerobik metabolizmaya sahip olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden oluşmaktadır (64).

Oksijen, dış orbitalinde iki adet eşleşmemiş elektronuyla biyolojik sistemlerde önemli yere sahip bir serbest radikaldir. O<sub>2</sub> ile tepkimeye giren moleküllerin meydana getirdiği serbest radikaller de biyolojik sistemde önemli bir yerdedir (12).

#### 2.6.1.1. Reaktif oksijen türleri

Reaktif oksijen radikalleri; oksijen metabolizması esnasında az miktarda üretilen süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>)'dir. ROT, çeşitli serbest radikallerin üretildiği serbest radikal zincir reaksiyonlarını indükleyebilirler. Serbest radikal üretimi aşağıda gösterilmiştir (Şekil 10).



**Şekil 10:** Serbest radikal oluşumu (14)



**Şekil 11:** Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu (14)

Moleküler oksijen ( $O_2$ ), paralel spinli iki eşleşmemiş elektrona sahiptir (64). Eşleşmemiş elektrona sahip atom, atom grubu ya da moleküller serbest radikal olarak isimlendirilir (Şekil 11). Fakat  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Mo^{+5}$  gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal kabul edilmez ancak serbest radikal üretiminde önem arz ederler. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) ya da nötral olabilir.

Serbest radikal tanımlanmasına göre moleküler oksijen, biradikal (diradikal) olarak kabul edilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş tepkimeye girmesine rağmen diğer serbest radikallerle çok daha kolay tepkimeye girer (5).

**Tablo 1:** Reaktif oksijen partikülleri (14)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit anyon radikali ( $O_2^-$ )	Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )
Hidroksil ( $HO^\cdot$ )	Singlet oksijen ( $^*O_2$ )
Peroksi( $ROO^\cdot$ )	Ozon ( $O_3$ )
Alkoksil ( $RO^\cdot$ )	Hipokloroz asit ( $HOCl$ )
Nitrik oksit( $NO^\cdot$ )	Lipit hidroperoksit ( $LOOH$ )

Moleküler oksijen her kademedede indirgenerek yukarıda tanımlanan reaktif  $O_2^-$  metabolitlerinin oluşmasına neden olur.  $O_2^-$  tek başına hücrenin yıkılmasına sebep olan tepkimeleri indükleyebildiği gibi, aslında daha reaktif oksijen radikallerinin oluşmasına da



neden olarak hücre toksisitesinde rol oynar (12). Reaktif oksijen metabolitlerinden en çok karşılaşılanları ise şunlardır (Tablo 1).

### **Süperoksit Radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

Süperoksit radikali bütün aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile meydana gelir. Süperoksit radikali doğrudan hasar vermez. Bu radikalin önemi ise hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metallerini indirgeyici olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha da reaktiftir (64).

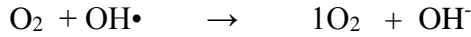
Süperoksit radikali, SOD vasıtasıyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye indirgenir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ortaklanmamış elektron bulundurmadığından tek başına radikal değildir (10).

Ortamda toplanan süperoksit radikallerinin girebileceği reaksiyonlar aşağıdaki gibidir (62).

1. Ortamda bulunan bir protonu alıp perhidroksi radikali (HO<sup>-2</sup>) oluşturabilir.
2. Hidrojen peroksit ile reaksiyona girip hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>) ve singlet oksijen (1O<sub>2</sub>) oluşturabilir.



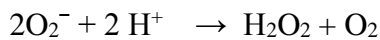
3. Hidroksil radikaliyle reaksiyona girip singlet oksijen üretimine sebep olur.



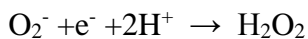
SOD, süperoksit radikalının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir.

### **Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süperoksidin etrafındaki moleküllerden bir elektron alması ya da moleküler oksijenin etrafındaki moleküllerden iki elektron alması sonucunda meydana gelen peroksidin iki proton (H<sup>+</sup>) ile birleşmesiyle üretilir. Biyolojik sistemlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin esas üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile gerçekleşir. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu tepkimesinde iki proton alıp H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijeni şöyle oluştururlar:



Oksijen iki elektronla indirgenmesiyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretilir.

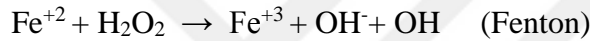


Bu tepkime; radikal olmayan ürünler açığa çıktığından, dismutasyon reaksiyonu olarak adlandırılır, ya spontan oluşur ya da SOD enziminin katalizlenir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bir serbest radikal olmamasına rağmen reaktif oksijen radikali (ROR) kapsamındadır ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir roledir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçiş metallere varlığında en önemli SOR olan OH• radikalının meydana gelmesini sağlar. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin diğer bir görevi de hücre içi sinyal molekülü olarak görevli olmasıdır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretildikten sonra CAT, GPx ve peroksiredoksinler isimindeki üç enzim sisteminin uzaklaştırılması (12).

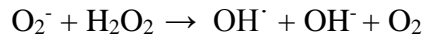
### **Hidroksil Radikali (OH•)**

Hidroksil biyolojik sistemlere diğer ROT'lardan daha da tahribat veren, biomoleküllerle tepkimeye girebilen güçlü bir radikaldir. Meydana gelebilmesi için ortamda geçiş metallere olması gereklidir. Şu yollarla oluşabilir (37).

#### 1. Fe (Demir) Katalizli - Haber Weiss reaksiyonu (Fenton Reaksiyonu)



2. Katalize olmayan Haber Weiss reaksiyonundaysa, süperoksidin doğrudan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona girmesiyle oluşabilir (12).



Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den meydana gelmektedir. Aynı zamanda suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalmasıyla oluşur. Hidroksil radikali gayet reaktif olan bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü ise çok kısadır. Hidroksil radikali ihtimalen ROR'ların en güçlü olanıdır (12).

### **Singlet Oksijen (\*O<sub>2</sub>)**

Enerji absorpsiyonuyla oksijenin eşleşmemiş dış elektronlarını değiştirip aynı ya da farklı orbitale yerleşebilirler. Uyarılmış bu oksijene ise singlet oksijen denir. Reaktif olmayan fakat ROR'lardan olan singlet oksijenin sigma ve delta olarak iki çeşiti vardır (12). Sigma formu çok enerjiktir ve yarı ömrü kısadır, çok hızlı bozunarak delta formuna dönüşür.

Singlet oksijen radyasyon sonucunda oluşabileceği gibi invivo olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloperoksidaz tepkimeleriyle de üretilebilmektedir. Karotenler, bilirubin, histidin, methionin, 2-5 difenilfuran, 1,4 diazbisikloalefan, singlet oksijeni temizlerler. Singlet oksijen, DNA, RNA, proteinler, lipitler ve sterollerini içeren çok sayıda biyolojik hedeflerle tepkimeye girip hücrede tahribatlar oluşturur (12).

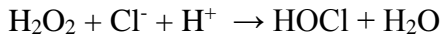
### **Hidroperoksil Radikali (HO<sub>2</sub>• )**

Süperoksit, asidik ortamda daha da reaktif bir radikal olan hidroperoksile dönüşür. HO<sub>2</sub>• nin dismutasyon hızı yüksek olduğundan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi de çok miktarda artar. Hidroperoksil radikalının lipitte çözünübilirliği süperoksite göre fazladır ve daha da kuvvetli bir oksidandır. Aynı zamanda hidroperoksil radikali asidik pH'da süperoksite nazaran 108 kat daha da hızlı şekilde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşür (12).

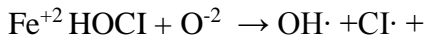
### **Hipokloröz Asit (HOCl)**

Hipokloröz asit de radikal olmamasına rağmen ROT arasında yer alır. Radikal oluşumu fagositik hücrelerin bakterileri yok etmesinde önemli yere sahiptir. Özellikle nötrofillerde olan miyeloperoksidaz enzimi vasıtasıyla O<sub>2</sub>'nin dismutasyonu ile üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi klorür iyonu ile birleştirip güçlü antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür (12).

### **Myeloperoksidaz**



Hipokloröz asit Fe<sup>+2</sup> bağımlı ve Fe<sup>+2</sup> bağımsız bir tepkimeyle OH• üretimini artırabilir (31).



### **2.6.2. Serbest radikallerin üretimi**

Dokularda üretilen ROR ile serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik öneme sahip materyallere hasar verebilir. Serbest radikaller metabolizmaya dışardan gelebileceği gibi metabolizma sonucu olarak da oluşmaktadır. Serbest radikallerin endojen olarak yapımı farklı yollarla olmaktadır. Buna rağmen, canlı organizmalar da serbest radikallerin potansiyel yıkım etkilerine rağmen kendini savunmak için farklı mekanizmalara sahiptir (28).

Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları olup, hücrel metabolizma esnasında sürekli üretilir. Mitokondrial elektron transport zinciri, oksidan enzimler (ksantin oksidaz, siklooksijenaz), fagositler, nötrofiller,  $FeP^{+2}$  ve epinefrinin hücrel otooksidasyonu endojen kaynaklardır. Okside ilaçlar (CCIB4B, asitaminofen), sigara, radyasyon, glutatyonu oksidize eden maddeler de eksojen kaynaklardır (40).

### **2.6.3. Endojen/Eksojen serbest radikal oluşum mekanizmaları**

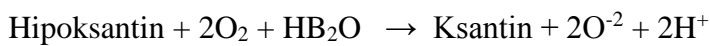
#### **Endojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizması**

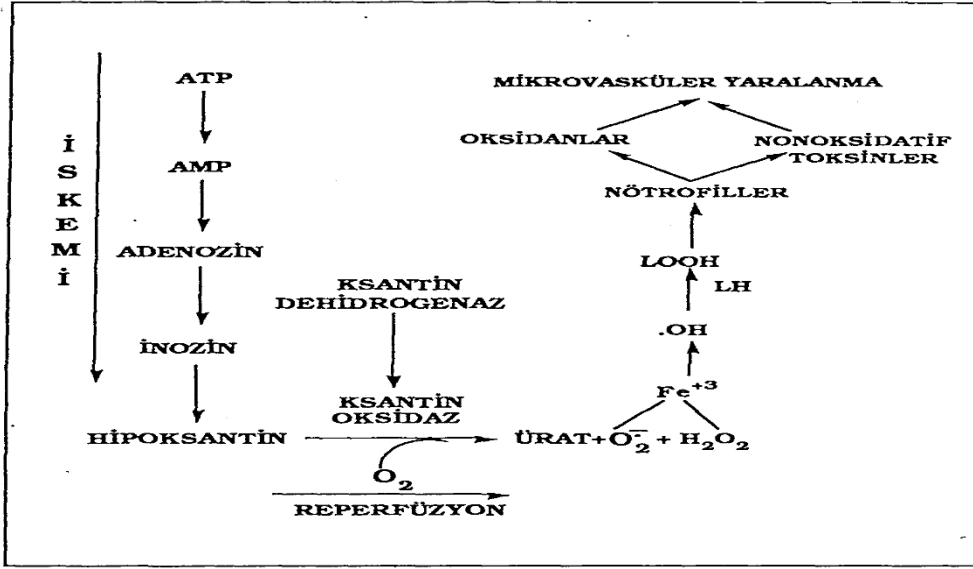
Otooksidasyon; atmosferik oksijenin katalizlediği serbest bir radikal reaksiyondur. Serbest radikallerin oksijenle tepkimesi çok hızlıdır. Böyle tepkimelerin başlaması için farklı mekanizmalar gelişmiştir. Özellikle fosfolipidler ve çoklu doymamış yağ asitleri otooksidasyon için meyillidirler. Otooksidasyonda ilk üretilen ana ürünlerin hidroperoksit (ROOH) ürünleri olduğu bilinmektedir (28).

Mitokondrial elektron transport zinciri; normal koşullarda hücrel metabolizmada serbest radikaller oluşur. Oksidatif fosforilasyon esnasında ATP üretilmesi için moleküler  $O^{-2}$  suya dönüşmektedir. Fakat  $O_2$ 'nin %1-5'i bu yoldan kaçınıp serbest oksijen radikallerinin üretildiği farklı biyokimyasal yollara katılır. Aynı zamanda mitokondrial elektron transport zinciri ve otooksidasyon da serbest radikal oluşmasına katkı sağlar. İç mitokondrial zarda elektron bulunan transport enzim kompleksi  $H_2O_2$  oluşur. Mitokondrial solunum arttığı zaman serbest radikal üretimi de artar. Aynı zamanda hipokside olduğu gibi terminal sitokrom azaldığında da mitokondrial elektron transport zincirinde  $O^{-2}$  oluşumu artar (39).

Ksantin Oksidaz (XO); canlı sistemde ROT üreten temel enzimatik kaynaklardan biridir. XO'nun faaliyetinin sonunda süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri meydana gelmektedir (Şekil 12). XO'nun beyinde ödem, iskemi, damar geçirgenliğinde farklılıklar gibi oksidatif tahribatlara sebep olduğu aynı zamanda hepatit ve beyin tümörü durumlarında da XO'nun serum düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (28).

Sitoplazmik bir enzim olan XO purin metabolizması esnasında  $O_2$ 'nin indirgenmesi sonucunda  $O^{-2}$  oluşturur.





**Şekil 12:** Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması (14)

Zar fosfolipidlerinin parçalanmasıyla serbest yağ asitleri meydana gelir. Serbest yağ asitlerinin en önemli olanı araşidonik asittir. Araşidonik asit; serbest radikallere, prostoglandinlere ve lokotrienlere metabolize olabilirler. Bu maddeler, nötrofillerin endotelyuma adhezyonunu artırıp, İ/R hasarının meydana gelmesinde etkilidirler. Araşidonik asit metabolizmasının sonucunda serbest radikalın üretilmesine "enzimatik lipid peroksidasyonu" denilir (12).

Endoplazmik retikulum, endoplazmik ve nükleer membranlar serbest radikal üretilmesinde görev alan diğer hücresel yapılardır. Bu membranlarda, yağ asitlerini oksitleyerek serbest radikal oluşturan sitokrom P-450 sistemi mevcuttur (39). Kimyasal ajanların serbest radikal üretimindeki en önemli olan mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemiyle aktifleşmesidir (37).

Peroksizomlar, hücre içi  $H_2O_2$  kaynağı olması nedeniyle çok önemli yere sahiptirler. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açil-CoA oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit oluşturmada çok miktarda  $H_2O_2$  üretilmesine sebep olurlar (30).

Plazma membranı; hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle çok rahat tepkimeye girip peroksidasyon ürünleri açığa çıkarırlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımına lipid peroksidasyonu denilir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde yol alır ve çok fazla zararlıdır (4, 5).

Redoks döngüsü, hücrenin içindeki birçok çözünür sitozolik moleküller oksidasyon-redüksiyon tepkimesine uğrar.  $O_2^{\cdot -}$ 'nin spontan dismutasyonu ile da  $H_2O_2$  üretilir (40).

Fagositlerin uyarılması, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukozun oksidasyonunun artışına sebep olur. Solunumsal patlama esnasında elektron verici NADPH'tır ve moleküler oksijenin süperoksit radikaline indirgenmesiyle  $NADP^+$  oluşumu artar, heksoz monofosfat yolu aktive olur. Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-hem bulunduran miyeloperoksidaz enzimi içerir. Miyeloperoksidaz,  $H_2O_2$  bulunduğunda iyodür, klorür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyip hipoklorik asit (HOCl), hipobromik asit (HOBr) ve hipoyodik asit (HOI) oluştururlar (Tablo 2). Bu bileşikler ve bu bileşiklerin tuzları güçlü oksidandırılar, ayrıca bunlar biyolojik olarak önemli bazı moleküllerle tepkimeye girip mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar açığa çıkarırlar (4, 5, 40).

**Tablo 2:** Fagositlerin oluşturduğu bazı reaktif oksidan ürünler (14)

Trombositler	$H_2O_2$ , $O_2^{\cdot -}$ , $OH^{\cdot}$
Eozinofiller	$H_2O_2$ , $O_2^{\cdot -}$ , $OH^{\cdot}$ , HOCl
Makrofajlar	$H_2O_2$ , $O_2^{\cdot -}$ , $OH^{\cdot}$ , HOCl , $NO^{\cdot}$
Nötrofiller	$H_2O_2$ , $O_2^{\cdot -}$ , $OH^{\cdot}$ , HOCl

Fagositin kendisi de reaktif oksidanların tahribatlarına karşı hassastır. Ayrıca oksidanlarına karşı kendilerini koruyabilirler. Fagositlerin antioksidan sistemleri,  $H_2O_2$ 'yi suya indirgeyen CAT, süperoksidi  $H_2O_2$ 'ye dönüştüren SOD,  $H_2O_2$ 'yi detoksifiye eden GPx-GR sistemi, antioksidan vitaminlerden olan  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) ve askorbik asit (vitamin C) gibi antioksidanlardır (4).

#### **Eksojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizması**

Eksojen serbest radikaller, çok doymamış yağ asitleri içerikli beslenme, fazla kalorili beslenme (obesite), hayvansal proteinlerce zengin beslenme, alkol, hava kirliliği ( $O_3$ ,  $NO_2$ ,  $SO_2$ , hidrokarbonlar), sigara dumanı, radyasyon, diğer kirlenmeler (asbest, pestisitler, vs.) ve antikanser ilaçlar gibi eksojen nedenlerle de oluşabilmektedir (64, 37).

## 2.6.4. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikal etkileri hücre içi ve hücre dışı etkiler olarak iki başlık altında incelenebilir.

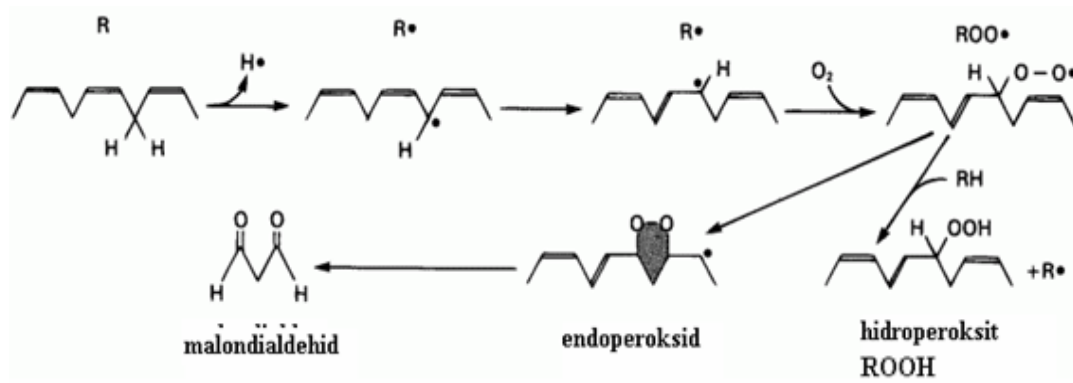
### 2.6.4.1. Hücre içi etkileri

#### 2.6.4.1.1. Lipit peroksidasyonu

Biyolojik moleküllerin bütünü serbest radikallerce etkilenir, fakat lipitler serbest radikalin hasarından en çok etkilenen biyomoleküldür. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle rahat reaksiyona girip peroksidasyon ürünleri açığa çıkarırlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin ve kolesterolün oksidatif olarak hasarına lipit peroksidasyonu denir. Lipit peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (40).

Hücre membranlarında lipit serbest radikallerinin ve ayrıca lipit peroksit radikallerinin üretimi, ROT'lardan kaynaklanan hücre hasarının önemli bir özelliğidir. Serbest radikallerden kaynaklanan lipit peroksidasyonu "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" olarak adlandırılır. Hücre membranında lipit peroksidasyonuna uğrayan temel yağ asitleri poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitleridir. Lipit radikallerinin ( $R^*$ ) moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda lipit peroksit radikalleri ( $ROO^*$ ) üretilir.

Lipit peroksit radikalleri membranın yapısında bulunan diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyip yeni lipit radikallerinin üretilmesine neden olurken kendileri de oluşan hidrojen atomlarını alıp lipit peroksitlerine ( $ROOH$ ) dönüştürler ve bunun sonucunda reaksiyonlar kendi kendini katalizleyip devam ederler (37).



Şekil 13: Lipit peroksidasyonu sonucu MDA oluşumu (14)

Lipid peroksidleri yıkıldığı zaman birçok biyolojik olarak aktif olan aldehitler meydana gelmektedir. Üç ya da daha fazla çift bağ bulunduran yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA üretilir (Şekil 13). Bu bileşik idrarda, kanda oluşur. Yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif indikatörü olmayarak lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu sebepten dolayı biyolojik materyalde MDA ölçümü lipid peroksid seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Lipid peroksidasyonu çok zararlı olan bir zincir reaksiyonudur (4, 5).

Lipit Peroksidasyonunun Organizma Üzerindeki Bazı Etkileri;

1. Lipit peroksidasyonu sonucunda membran akışkanlığı azalır ve normal durumda hücre içine geçemeyen maddelerin hücre içine girişlerinde artış olur.

2. Hücre membranına yakın yerleşimde bulunan DNA molekülleri de lipit peroksidasyonundan hasar görürler ve bazen DNA'nın replikasyonu gerçekleşemez.

3. Lipit peroksidler ve alkoksil radikaller, sistein ve triptofan gibi protein kısımlarına ataklar yapıp protein yapısını bozarlar ve hasar oluştururlar.

Bazı aldehitler ise biyolojik sıvılarda kemotaktik etkiye sahiptirler.

MDA gibi aldehitler, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein)'yi modifiye edip metabolik yolu değiştirebilirler (40).

#### 2.6.4.1.2. Karbonhidratlara etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de etkileri bulunmaktadır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda peroksidler,  $H_2O_2$  ve okzoaldehitler açığa çıkmaktadır. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar yapabilme yeteneğinden dolayı antimitotik etkide bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı kanser ve yaşlanma üzerinde rol oynarlar (4).

#### 2.6.4.1.3. Proteinlere etkileri

Serbest radikallerin proteinler üzerindeki etkinlik derecesi amino asit bileşimine bağlıdır. Yapısında kükürt olan tirozin, histidin, sistein, fenilalanin, metiyonin, triptofan gibi amino asitlere sahip olan proteinler serbest radikallerden çok rahat etkilenirler. Bundan dolayı özellikle karbon merkezli olan organik radikaller ve sülfür radikalleri açığa çıkmaktadır. Serbest radikal tahribatında, içeriğinde çok miktarda disülfid bağı olan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur ve normal işlevlerini yapamaz duruma gelirler (37).



#### 2.6.4.1.4. Nükleik asitler üzerine etkileri

Radyasyon ile meydana gelen serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede ölüme, mutasyona sebep olurlar. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozla kolayca tepkimeye girip farklılıklara neden olur. Aktifleşmiş nötrofillerden kaynaklı hidrojen peroksit membranlardan kolay geçip ve hücre çekirdeğine ulaşır hücre disfonksiyonuna, DNA hasarına ve hücre ölümüne neden olabilir (5, 40).

#### 2.6.4.2. Hücre dışı etkiler

##### 2.6.4.2.1. Kemotaksi

Serbest radikaller, kemotaktik faktör veya proinflamatuvar moleküller olarak bilinen endotel hücrelerden olan platelet aktive edici faktör (PAF), histamin, LTB4 salınımına neden olurlar. Böylelikle bu kemotaktik faktörlerin etkisi, dolaşımdaki lökositlerin patoloji bölgesinde yoğunlaşmalarını ve endotelle olan ilişkilerinin artmasını sağlar (31).

##### 2.6.4.2.2. Rolling

Normal şartlarda dolaşımda bulunan lökositler, damar endoteliyle çok nadir temasta bulunur. ET, İ/R ile açığa çıkan radikaller tarafından uyarılması sonucunda lökositler ve nötrofiller kendi çevrelerinde yuvarlanmaya başlar. Bu yuvarlanmayı ise aynı grupta olan üç molekül yönlendirir. Bunlar lökositlerde olan L-selektin, endotel hücrelerinde bulunan P ve E selektindir. L-selektin, lökositlerin birçoğunda bulunmasının yanı sıra en yoğun olarak bulunduğu grup nötrofillerdir. L-selektin, aktifleşmemiş nötrofillerin uyarılmış endotel hücrelerindeki P ve E selektinlerle birleşerek ilk rolling durumunun başlamasından sorumludur. Yuvarlanma L, P ve E selektinlerin etkileşmesi sonucunda lökositlerde olmaktadır (33).

##### 2.6.4.2.3. Antiadhezyon molekülleri inhibisyonu

Kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen endotel hücreleri İ/R'nin zararlı etkilerine karşı gayet hassas bir yapıdadır. Uzamış hipoksinin iyon dağılımını bozduğu, membran potansiyelini değiştirdiği, hücre içi hacmi artırıp membran akışkanlığını azalttığı ve endotel hücrelerinin yapısal düzenini bozduğu bilinmektedir. Bu farklılıklara enerji depolarının tükenmesi, prostasiklin, NO gibi bazı biyoaktif ajanların oluşumunda azalma ve ET, tromboksan A<sub>2</sub> üretiminde artma durumu eşlik eder. Benzer olarak hipoksik endotel hücrelerinde bazı genler uyarılır (örn. adhezyon molekülleri ve sitokinler) ve diğerleri (örn.

nitrik oksit sentaz ve trombomodulin) ise baskılanır. Endotel hücrelerinin hipoksiye tepkileri reperfüzyon ile arttırılır (36).

SOR, NO'yu inhibe eder. NO, kararsız olan bir nitrat bileşimidir. Damarlarda gevşemeye yol açması, ilk belirlenen işlevi olup organizmada birçok biyolojik görevlerde de yer alır. Kalp, bağırsak, kas ve deri gibi birçok organ sisteminde bulunduğu bilinmektedir. Endotel hücreleri, lökositler gibi birçok hücreden salınabilir. NO, lökosit endotel adhezyonuna engel olan en önemli endojen moleküldür. Fakat NO salınımı, reperfüzyon hasarı sürecinde oluşan süperoksitin, endotel hücrelerine etkisiyle inhibe olur (64).

Adhezyondan sonra özellikle nötrofiller endotel hücrelerinin arasından diapedez ile dokuya geçip burada birikir ve proteolitik enzim, aktif oksijen (respiratuvar patlama) ve inflamatuvar sitokinlerle doku hasarını başlatırlar (28).

## **2.7. Antioksidanlar**

### **2.7.1. Antioksidan savunma sistemleri**

Serbest radikaller, organizmada normal metabolik yolların işleyişleri esnasında devamlı oluşan ve endojen antioksidanlar denilen moleküller tarafından etkisiz hale getirilen maddelerdir. Oksidan moleküller belirli seviyede kaldıkları müddetçe, organizmanın infeksiyon ajanlarına ve yabancı maddelere karşı önemli savunma molekülleridir. Ancak belirli seviyenin üzerinde üretildiklerinde ya da antioksidan sistemin yetersizliğinde serbest radikal molekülleri, organizmanın yapı elemanları olan karbonhidrat, lipit, protein, nükleik asitler ve enzimleri bozup hasarlara sebep olurlar (39).

Hücrede meydana gelen serbest radikallerin detoksifikasyonu bilhassa daha çok enzimatik mekanizmalarla oluşur. Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını  $O_2^-$  radikalini ve  $H_2O_2$ 'yi ortamdaki temizleyen özel enzimler meydana getirir. Bunlar radikal süpürücü olarak bilinen CAT, SOD ve GPx enzimleridir (30).

Antioksidanların etkileri dört farklı şekildedir:

**1) Toplayıcı etki:** Reaktif oksijen radikallerini etkileyip onları tutma ya da daha zayıf olan yeni moleküle dönüştürme şeklindedir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterirler.

**2) Bastırıcı etki:** ROR'lar ile etkileşerek onlara bir hidrojen aktarım aktivitesini azaltma ya da inaktif şekle çevirme şeklindedir. Flavanoidler, vitaminler bastırıcı etki grubunda olan antioksidanlardandır.

**3) Zincir kırıcı etki:** ROR'ları bağlayıp zincirlerini kıran ve fonksiyonlarını engelleyen etkidir. Mineraller, hemoglobin, seruloplazmin zincir kırıcı etkiye sahiptirler.

**4) Onarıcı etki:** Serbest radikallerin açığa çıkardıkları hasarın onarılması şeklindedir (5).

#### 2.7.1.1. Doğal antioksidanlar (endojen)

Antioksidanlar, endojen kaynaklı ya da eksojen kaynaklıdır. Eksojen antioksidanlar; ilaçlar, vitaminler ve gıda antioksidanları olarak sınıflandırılabilir. Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olarak iki sınıfa ayrılırlar.

**Enzim olan endojen antioksidanlar** şunlardır (4, 5)

- 1) Süperoksit dismutaz (SOD),
- 2) Katalaz (CAT),
- 3) Glutatyon peroksidaz (GPx),
- 4) Glutatyon S-Transferazlar (GST),
- 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi,
- 6) Hidroperoksidaz

**Enzim olmayan endojen antioksidanlar** şunlardır (4, 5, 40)

- 1) Hemoglobin
- 2) Miyoglobin
- 3) Ferritin
- 4) Bilirubin
- 5) Melatonin
- 6) Seruloplazmin
- 7) Transferin
- 8) Albümin
- 9) Metiyonin
- 10) Glutatyon
- 11) Sistein
- 12) Ürat
- 13) Laktoferrin

#### 2.7.1.2. Eksojen antioksidanlar

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır (4, 5)

- 1) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)

- 2) Trolox-C (vitamin E analogu)
- 3) Rekombinant süperoksit dismutaz
- 4) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflatuar ilaçlar, diphenyline iodonium)
- 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- 6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- 7) Demir şelatörleri
- 8) Sitokinler (TNF ve IL-1)
- 9) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- 10) Nötrofil adhezyon inhibitörleri
- 11) Barbitüratlar

#### 2.7.1.3. Gıda antioksidanları

Gıdalardaki eksojen antioksidanlar şunlardır (4, 5):

- 1) Demir(Fe)-superoxyde dismutase
- 2) Sodium benzoate
- 3) Propylgalate
- 4) Butylated hydroxytoluene (BHT)
- 5) Butylated hydroxyanisole (BHA)
- 6) Ethoxyquin

Vitamin eksojen antioksidanlar ise şunlardır (4,5):

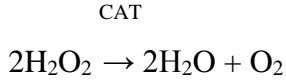
- 1) Folik asit (folat)
- 2) Askorbik asit (vitamin C)
- 3)  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E)
- 4)  $\beta$ -karoten(vitamin A)

#### 2.7.1.4. Enzimatik antioksidanlar

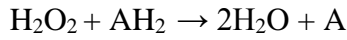
##### 2.7.1.4.1. Katalaz (CAT)

Katalaz 60 kDa ağırlığında olup 4 adet aynı yapıda (tetramerik yapıda) hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi ise  $H_2O_2$ 'yi suya ve oksijene parçalamaktır. Peroksidaz

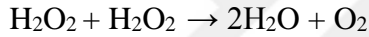
aktivitesine sahiptir ve buna ilaveten CAT enzimi bir molekül  $H_2O_2$ 'yi elektron verici bir substrat olarak, bir diğeri ise oksidan ya da elektron alıcısı olarak kullanabilir (4, 22).



CAT enzimi peroksizomlarda yer alıp kemik iliği, kan, mukoz membranlar, böbrekte ve karaciğerde yüksek miktarlarda bulunur. CAT önemli aktivite olarak düşük hızlarda  $H_2O_2$ 'nin açığa çıktığı durumlarda veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı yer aldığı anda peroksidatif reaksiyonla  $H_2O_2$ 'yi suya dönüştürür.

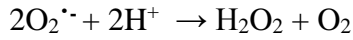


$H_2O_2$  oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise aşağıda belirtilen katalitik reaksiyonla  $H_2O_2$ 'yi suya dönüştürüp ortamdan uzaklaştırmış olur (29).



#### 2.7.1.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD, oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde vardır. Öyle ki süperoksitin  $H_2O_2$  dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. SOD süperoksit serbest radikalinin  $H_2O_2$  ve moleküler oksijene dönüşümünü aşağıda belirtilen tepkime ile katalizleyen antioksidan bir enzimdir (31, 65).



Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle olur. SOD,  $O_2^{\cdot-}$  radikalini metabolize eder. Ayrıca daha fazla zarar veren hidroksil radikalinin açığa çıkmasını önler. Dahası  $O_2^{\cdot-}$  radikalini  $H_2O_2$ 'ye ve moleküler  $O_2$ 'ye dönüştürür. Tepkime ürünü olan  $H_2O_2$  tarafından inhibe edilir.

SOD enzimi metalloprotein yapıdadır. Hücrelerde çeşitli şekillerde bulunur. Bunlar:

SOD-1: Cu-Zn SOD, stoplazmada bulunur.

SOD-2: Mn-SOD, mitokondride bulunur.

SOD-3: Fe-SOD, bazı bakterilerde karşılaşılmıştır.

SOD-4: Ni-SOD, bazı bakteri türlerinde bulunur.

İnsanlarda SOD enzimi: Sitosolik Cu/Zn-SOD; mitokondrial Mn-SOD; plazma, lenf ve sinovyal sıvılarda bulunan ekstrasellüler SOD olmak üzere 3 formda bulunur (31).

SOD,  $O_2^{\cdot}$  molekülleri ile kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir. Sulu ortamda spontan olarak ve hızlı şekilde dismutasyona uğrayıp  $O_2$  ve  $H_2O_2$  meydana getirir. SOD varlığı dismutasyon hızını  $10^4$  kat artırmaktadır. Böylelikle  $O_2^{\cdot}$  radikalinin potansiyel substrat ile tepkimeye girmesi ve  $OH^{\cdot}$  gibi daha toksik ürünlerin oluşumu SOD tarafından engellenmiş olur. Organizmada oksidatif stresin ve dokuda  $PO_2$ 'nin artmış olduğu durumlarda SOD enzim aktivitesi artar.

$H_2O_2$ , Fenton reaksiyonu ya da Haber-Weiss reaksiyonları ile daha da reaktif olan  $OH^{\cdot}$  radikali açığa çıkarabilir. Oluşan  $H_2O_2$ 'ye karşı ikinci savunma CAT ve GPx denzimleri ile gerçekleşir (31).

#### 2.7.1.4.3. Glutasyon redüktaz (GR)

GR, bir flavin enzimdir; hem sitozolde hem mitokondride bulunur. Ayrıca koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD'dır. GPx aracılığı ile hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucunda açığa çıkan okside glutasyonun (GSSG) tekrardan indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşümünü şu şekilde katalize eder (4).

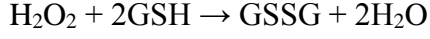


Şekil 14: İskemide glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın rolü (14)

#### 2.7.1.4.4. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon sistemi, oksidatif hasarın azaltılmasında görev alan, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna sebep olan ve lipit peroksidasyonunu engelleyen en önemli

endojen mekanizmalardan biridir. İntrasellüler glutatyon şeklinde bulunan en güçlü thiol bileşimidir. GPx enzimi, glutatyondan ayrılarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi suya dönüştürür. Ayrıca selenyuma bağlı sitoplazmik bir enzimdir, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi detoksifiye edip su ve okside glutatyona dönüştürür (Şekil 14).



GPx sitozolde mevcuttur, 4 selenyum atomu vardır ve tetramerik yapıdadır. GPx, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan bir enzimdir. Dahası fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGPx) olarak adlandırılan bir enzim monomerik yapıdadır ve esasen membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.



Diğer antioksidanlar ile beraber GPx, solunum patlaması esnasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin hasara uğramasına engel olur (4).

#### 2.7.1.4.5. Glutatyon-S-transferaz (GST)

Glutatyon S-transferazlar, her birinin iki alt birimden oluştuğu bir enzim ailesidir. Bunlar hepatositlerdeki temel detoksifiye edici sistemdir. GST'ler katalitik olan ve katalitik olmayan birçok sayıda işleve sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yapar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı görevleri vardır. GST'ler, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemince reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif olan konjugatlara dönüşümünü katalizlerler (4).

Başta linoleat hidroperoksitleri ve araşidonik asit olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı GST'ler GPx aktivitesi gösterirler (31).

GST



GST'ler, glutatyonun reaktif metabolitler ile konjugasyonunu gerçekleştirip organizmadan uzaklaşmasını sağlarlar (32).

#### 2.7.1.5. Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri

##### 2.7.1.5.1. Karotenoidler (B karoten)

Vitamin A'nın öncü maddesi olan  $\beta$ -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleri ile doğrudan etkileşip antioksidan fonksiyonunda olduğu saptanmıştır (4).

Karotenoidler ( $\beta$ -karoten, Lutein, Violaksantin, Likopen, Zeaksantin), genel olarak sarı ve turuncu renkli bileşikler olup bazı bakteri ve alglerde, çoğunlukta ise bitkilerde mevcut olan pigmentlerdir. İnsan ve hayvanlar karotenoid biyosentezini yapamadıklarından bu bileşikleri diyet ile alırlar. Karotenoidler, lipid membranlara lokalize olup membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltırlar (35).

##### 2.7.1.5.2. Glutasyon (GSH)

Glutasyon karaciğerde genetik bilgiye gerek kalmadan sentezlenebilen, sistein, glutamik asit ve glisinden meydana gelen güçlü bir antioksidan ve bir tripeptittir. Serbest radikaller ve peroksitler ile tepkimeye girip hücreleri oksidatif hasardan korurlar (66, 36).

##### 2.7.1.5.3. E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol)

Vitamin E çok güçlü olan bir antioksidandır. Hücre membran fosfolipidlerinde mevcut olan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluştururlar (67). Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna sahip olan aromatik halka bu moleküle antioksidan bir özellik kazandırır (34). Vitamin E; singlet oksijeni, süperoksit ve hidroksil radikallerini, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Vitamin E zincir kırıcı antioksidan olarak adlandırılır. Glutasyon peroksidaz açığa çıkmış peroksitleri yok ederken vitamin E peroksitlerin üretimini önler (29).

##### 2.7.1.5.4. C vitamini (askorbik asit)

Vitamin C, organizmada hidroksilasyon reaksiyonlarının çoğunda indirgeyici ajan görevindedir. Bununla birlikte kollajen üretiminde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Safra asitlerinin üretimindeki 7- $\alpha$ -hidroksilaz başlangıç basamağında görev alır. Lizinden karnitin üretiminde rol oynar. Demirin emilmesinde enzimatik olmayan bir yolla indirgeyici olarak rol alır, midede ise ferri demiri ferro demire indirger. İmmünite ve yara iyileşmesinde etkindir (4).

Vitamin C, güçlü indirgeyici aktivitesi sebebiyle ayrıca güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikaliyle tepkimeye girip onları ortamdan yok eder.



Askorbik asit, hem antioksidan hem de oksidan etkiye sahiptir. Askorbik asit proteine bağı olan ferri demiri uzaklaştırıp veya direkt ferri demiri indirgeyip Fenton reaksiyonunda  $H_2O_2$  ile etkileşmesine ve son aşamada hidroksil radikali oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Ancak bu etkinin fark edilebilmesi için sadece düşük konsantrasyonda olması gerekir, çünkü yüksek konsantrasyonlarda C vitamini güçlü antioksidan etkidedir. Ayrıca C vitamini fagositoz sırasında da önemlidir (6).

#### 2.7.1.5.5. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), en zararlı radikal olan hidroksil radikalini yok eden çok güçlü bir antioksidandır. Bu sebepten dolayı günümüzde antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilir. Melatonin antioksidanı aynı zamanda lipofilik özelliktedir. Bu nedenle hücrenin diğer organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan/beyin bariyerlerini de rahat aşabilir. Böylelikle geniş bir dağılımla antioksidan etkidedir. Melatoninin hücre çekirdeğine girebilme yeteneği, onun DNA'yı oksidatif hasardan koruması açısından diğer oksidanlara nazaran daha üstün bir özellik verir. DNA hasarının melatonin tarafından çok etkili şekilde inhibe edildiği belirtilmiştir. Yaşlanmayla melatonin sentezi de azalır. Bu da yaşlanma ve yaşlanmaya bağı olarak hastalıkların patogenezinde önemli görevi olabileceği bildirilmiştir (4).

#### 2.7.1.5.6. Seruloplazmin

Seruloplazmin ihtimalle SOD'a benzeyen mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri ( $Fe^{+2}$ ) ferri demire ( $Fe^{3+}$ ) yükseltgeyip Fenton reaksiyonunu ve böylelikle hidroksil radikali üretimini inhibe etmektedir (4).

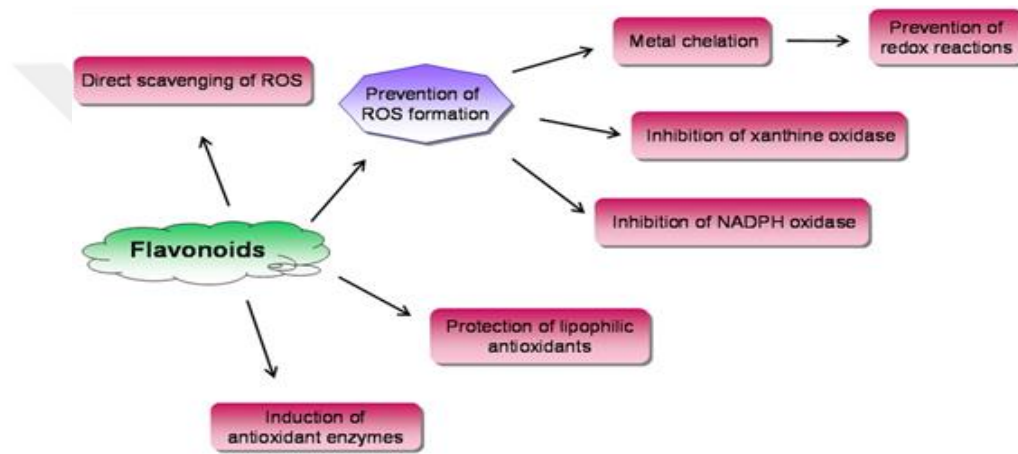
#### 2.7.1.5.7. Flavonoidler

Biyolojik sistemlerde bulunan aerobik metabolizma bazal şartlarda bile prooksidanlar olarak adlandırılan reaktif oksijen ürünlerini açığa çıkarırlar (2). Şayet prooksidanlar aşırı miktarda oluşursa oksidatif stres ya da oksidatif hasar oluşur. Eksojen kaynaklı antioksidanların çoğu bugün yaygın olarak kullandığımız gıdalarda bulunmaktadır.

Bunlar; bazı vitaminler, polifenoller, flavonoidler ve diğer bileşikler içerirler. Flavonoidler antioksidan özelliklerinin yanında ayrıca antialerjik, antiviral, antiinflamatuvar, antitrombotik ve diğer özelliklerinin de olduğunu belirtmektedir (68, 32).

Flavonoidler antioksidan özelliklerini gösterebilmeleri için serbest radikaller ile tepkimeye girip onları etkisizleştirirler. Flavonoidlerin etki mekanizmaları ise şu şekildedir (Şekil 15):

- a) Süperoksit radikali, singlet oksijeni ve hidroksil radikalini temizler.
- b) Peroksil radikalini (ROO•) ve alkoksil radikalini (RO•) yakalar, lipid peroksil (LOO•) zincirini ise kırar.
- c) Lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerini inhibe eder.
- d) Bakır ve demir gibi geçiş metallerini şelatlar.
- e) Enzim fonksiyonlarına bağımlı olan kalsiyum modinasyonu ile hücrel regülasyonda önemli role sahip küçük bir asidik protein olan kalmodülünü inhibe eder.
- f) Protein kinaz enzimini inhibe eder.
- g) Laktat transportunu önler (14).



**Şekil 15:** Flavonoidlerin antioksidan etki mekanizmaları (14)

#### 2.7.1.5.8. Ürik asit (ürat)

Normal plazma konsantrasyonunda ürat; hidroksil, peroksit, süperoksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler. Ürik asit, XO'nun oksid ürünleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi sonucunda açığa çıkar. İnsanlarda ve gelişmiş primatlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Vitamin C oksidasyonunu önleyen bir etkisi vardır. Ancak lipid radikalleri üzerine herhangi bir etkisi yoktur. Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikalleri toplayıcısıdır. Aynı zamanda albümin lipid hidroksiperoksitleri ve HOCl toplayıcısıdır. Bu fonksiyonlar da ürik asitin antioksidan etkilerinin var olduğunu göstergesidir (4).

## 2.8. Zerdeçal

*Zingiberaceae* familyasına ait olan *Curcuma longa* L. sarı renkli çiçekleri olan, çok yıllık otsu bir bitkidir. Hindistan, Endonezya, Çin, Peru, Jamaika ve Pakistan olmak üzere Asya'nın tropik bölgelerinde yetişirler. Hindistan'da haldi ismiyle bilinmektedir. Bitkinin toprak altında olan ana kökleri armut ve yumurta şeklinde, yan kökleri ise parmak (rizom) şeklindedir (Resim 1). *Curcuma* cinsini içeren *Zingiberaceae* familyasında 49 cins ve 1400 tür vardır (69).

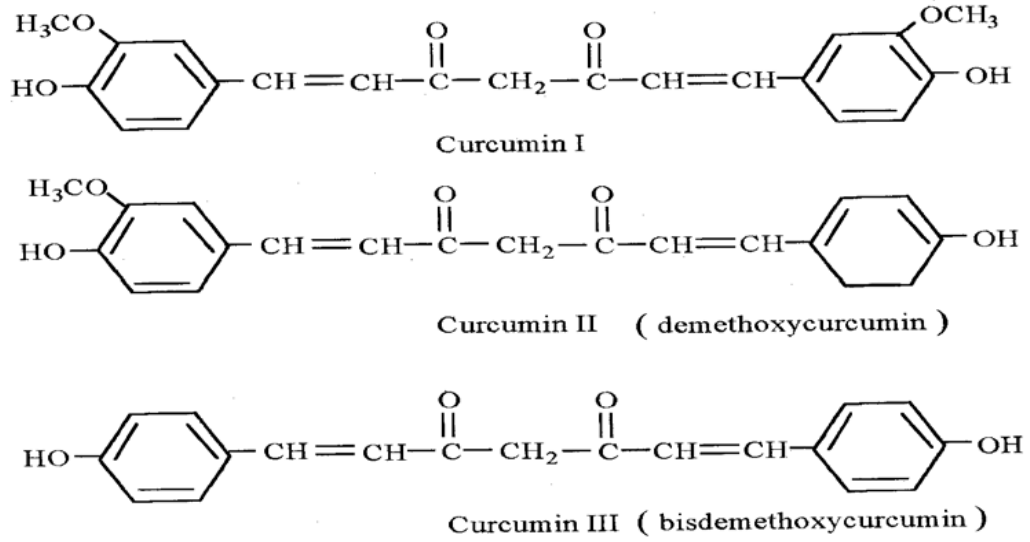


**Resim 1:** Zerdeçal bitkisi (69)

### **Kullanım Alanları**

Zerdeçal, ince derilerin ve ipek kumaşların boyanmasında ve kına yakmada ise renklendirici olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca eskiden turnusol kağıdı yerine zerdeçal kağıdı kullanılırdı. Balık çorbası, peynir turşusu, pilav, tavuk bulyon, soslar, söğüş ve çeşitli sebze yemeklerine çeşni olarak eklenir. İspanyolların deniz ürünlerinden yapılan "paella" adındaki ünlü yemeğinde ve Hintlilerin "köri" sosunda kullanılmaktadır. Hindistan tıbbında çok büyük öneme sahip olan zerdeçalın; karaciğer rahatsızlıkları, romatizma, öksürük, sinüzit, nezle ve anoreksiya tedavilerinde kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca alyuvarda kan temizleyicisi, tonik ve deri hastalıkları tedavisinde de kullanıldığı bilinmektedir (69).

### 2.8.1. Zerdeçalın kimyasal içeriği



**Şekil 16:** Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı (69)

#### **Zerdeçalın etken maddesi**

Genellikle gıdalarda renk vermesi için kullanılan zerdeçal ısıya dayanıklı, kokusuz, yapısında antioksidan bir bileşik olan tetrahidrokurkumin içermektedir. Curcuminoidler (curcumin, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin) zerdeçalın ana bileşenini oluştururlar (Şekil 16). 184°C’de eriyen curcuminin molekül formülü C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> olup zerdeçalın %3-5’ini oluşturmaktadır. Aseton ve etanolde çözünebilirler fakat suda çözünemezler.

Zerdeçal gıdalarda peroksit oluşumunu önleyip muhafaza süresini artırmaktadır. Zerdeçalın lipit oksidasyonunu engellemede vitamin E’den daha da etkin olduğu bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada tavuk kıymasına 400 ppm oranında zerdeçal ekstraktı katılmış ve antioksidan özelliği incelenmiştir. Araştırmanın sonuçları kontrol grubuyla kıyaslandığında zerdeçal ekstraktının önemli derecede etkili olduğu bulunmuştur. Zerdeçalın antioksidan özelliğinin içeriğinde bulunan fenolik bileşenlerden kaynaklandığı bilinmektedir (69).

Yine başka bir çalışmada curcuminoidlerin antioksidan özellikleri araştırılmış ve bu ekstraktların antioksidan kapasitelerinin askorbik asite eşdeğer olduğu bulunmuştur. 100 ppm BHT ile kıyaslandığında kurkuminin antioksidan aktivitesinin çok daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Zerdeçalda yüksek oranda bulunan ve fenolik bir bileşen olan curcuminin antioksidan özelliği araştırılmış ve yapılan çalışma neticesinde curcuminin gıda endüstrisinde güvenli bir şekilde kullanılacak bir antioksidan olduğu saptanmıştır (69).

Zerdeçal, SOR'ların bir temizleyicisi olarak etkinlik göstermektedir. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunu azaltmakta ve bu etkinliğini ise antioksidan enzimlerin aktivitelerini koruyarak yapmaktadır (70).

#### **Zerdeçalın etki alanları**

Zerdeçal, tedavi edici ve kanser önleyici özelliğinden dolayı yüzyıllarca geleneksel tedavilerde kullanılmıştır. Bu bitkiden oluşturulan ekstraktlar kanserli hücrelerin çoğalmasını ve yayılmasını önleyebilmektedir. Zerdeçal ile ilgili yapılan birçok çalışmaya rağmen zerdeçalın anti kanser mekanizması üzerindeki etkinliği konusunda aydınlatıcı bilgiye ihtiyaç vardır. Zerdeçal bileşenlerinin kanser metabolizmasında etkili olan bazı anahtar enzimler üzerine etkileri vardır. Bu enzimlerden biri ise adenozin deaminazdır. Adenozin deaminaz, hidrolazlar sınıfında yer alan bir enzimdir (71).



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu 29.09.2016/31 protokol no.lu onayıyla Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı tarafından, KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamız standart deneysel hayvan çalışmalarına uygun olarak yapıldı. Bu çalışma, KSÜ bireysel araştırma fonunun desteği ile gerçekleştirildi. Deneylerde kullanılan toplam 24 adet erkek Wistar-Albino cinsi rat KSÜ Tıp Fakültesi Deney hayvanları barınağından temin edildi. Sıçanlar 250-300 gram ağırlığında ve 4-5 aylıktır. Sıçanlar nemi (%45-50) olan ve  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  oda sıcaklığında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışıklandırmaya sahip odalarda tutulup standart rat yemi ve su verilerek beslendi.

#### 3.2. Deney Grupları

Bu çalışma 250-300 gram ağırlığında 24 adet erkek Wistar-albino cinsi rat üç gruba ayrılarak (kontrol grubu; n=8, sham grubu; n=8, zerdeçal ekstraktı uygulanan grup; n=8) gerçekleştirildi.

Tüm gruplardaki her bir rat ketamin ve ksilazin hidroklorid ile anestezi altında uyutulduktan sonra batin ön duvarı tüyleri kesilip povidon iyot ile temizlenerek steril şartlarda laparotomi uygulandı.

**Grup 1 (Kontrol):** 10 dk kalp iskemi ve 10 dk reperfüzyon uygulanan grup.

**Grup 2 (Sham):** 10 dk kalp iskemi-10 dk reperfüzyon + 1 mL IP yolla serum fizyolojik (%0,9 NaCl) verilen grup.

**Grup 3 (Zerdeçal):** 10 dk kalp iskemi-10 dk reperfüzyon + 1 mL zerdeçal (50 mg/kg/mL/gün) IP yolla uygulanan grup.

Sham ve zerdeçal gruplarındaki ratlara günde bir kez ve 7 gün boyunca 1 mL serum fizyolojik (% 0,9 NaCl/kg/mL/gün) ve 1 mL zerdeçal (50 mg/kg/mL/gün) IP yolla verilirken kontrol grubundaki ratlara hiç bir şey uygulanmadı.

#### 3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1, 1, 3, 3 tetrametoksipropan		Sigma
- Bakır sülfat	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sigma
- 2-[2-Tiyobarbitürik asit]	TBA	Merck

- Etilendiamin tetraasetik asit	Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma
- Disodyum hidrojen fosfat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	Merck
- Sodyum dihidrojen monofosfat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
- Dipotasyum hidrojen fosfat	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
- Potasyum dihidrojen fosfat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
- Folin-Ciocalteu	Fenol ayıracı	Sigma
- Lauril sülfat	SDS	Sigma
- Hidrojen peroksit	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck
- n-Butanol		Merck
- Piridin		Merck
- Hidroklorik asit	HCl	Merck
- Sodyum hidroksit	NaOH	Merck
- Sodyum karbonat	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
- Sodyum klorür	NaCl	Merck
- Sodyum potasyum tartarat	Na-K tartarat	Sigma
- Tris baz		Sigma
- Tris hidroklorit	Tris-HCl	Sigma
- β-Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat	β-NADPH	Sigma
- Formaldehit	HCHO	Sigma
- Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Sigma
- Asetik Asit	CH <sub>3</sub> COOH	Sigma
- Ksantin		Sigma
- CAPS		Sigma
- Ksantin oksidaz		Sigma
- Iodonitrotetrazolium klorür	INT	Sigma

### 3.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Derin Dondurucu	Samsung
- Hassas Terazî	Radwag
- UV Spektrofotometre	Shimadzu
- Buz Makinesi	Scotsman
- Distile su cihazı	Merck
- Manyetik Karıştırıcı	Mtops
- pH metre	Hanna Instruments

- Cam Kalem
- Fotoğraf makinesi
- Hayvan Kafesi
- Homojenizatör düzeneği
- Kronometre
- Lamel
- Lam
- Mezür (25mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL)
- Mikroskop
- Otomatik pipet, pastör pipeti
- Soğutmalı santrifüj Hettich
- Su Banyosu
- Vorteks

### **3.5. Kalp İskemi/Reperfüzyon Hasarı Modeli**

Çalışma KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Ratlar laboratuvara getirilip tek tek tartılarak her birine intramüsküler olarak 60 mg/kg dozunda ketamin hidroklorid (Ketalar flakon, Eczacıbaşı Türkiye) verilerek anestezi sağlandı.

Anestezi altında sıçanlara trakea entübasyonu yapıldı. Sıçanların yaklaşık 3 mm olmak üzere 4. ve 5. kotsalar sol toraktomi yapılarak göğüs kafesi açıldı (Resim 2). Perikardiyum uzaklaştırılıp, abdomene bası yapılarak kalp nazikçe göğüs kafesi dışına çıkarıldı (Resim 3) ve sol ön inen koroner arterin orjinine yakın yerinden 6/0 ipek iplikli atravmatik yuvarlak iğne geçirildikten sonra kalp tekrar göğüs kafesi içine bırakıldı. İpek ipliğin her iki ucu kısa bir polietilen borudan (iç çapı 1 mm, uzunluk 15 mm) geçirildi. 15 dakikalık stabilizasyon periyodundan sonra koroner arter etrafına yerleştirilen iplik bir klips yardımıyla sıkıştırıldı (Resim 4) ve 10 dakika süreyle geçici bölgesel iskemi yapıldı. İplerin gevşetilmesi ve borunun çıkarılması ile reperfüzyon gerçekleştirildi.

İlaç verdiğimiz gruplarda, etken maddeler intraperitoneal olarak iskemiden 60 dk önce IP yolla verildi ve daha sonra 10 dk kalp iskemi ve 10 dk reperfüzyona maruz bırakıldı. Sham grubundaki sıçanlara 10 dk kalp iskemi-10 dk reperfüzyon + 1 mL serum fizyolojik (%0,9 NaCl) 7 gün süresince IP yolla verildi. Serum fizyolojik cerrahi girişimden 60 dk önce uygulandı. Tedavi grubunda ise ön koşullama tekniği ile 10 dk kalp iskemi-10 dk reperfüzyon işleminden 60 dakika öncesi zerdeçal IP yolla deneklere verilip oluşturuldu. Zerdeçal (50

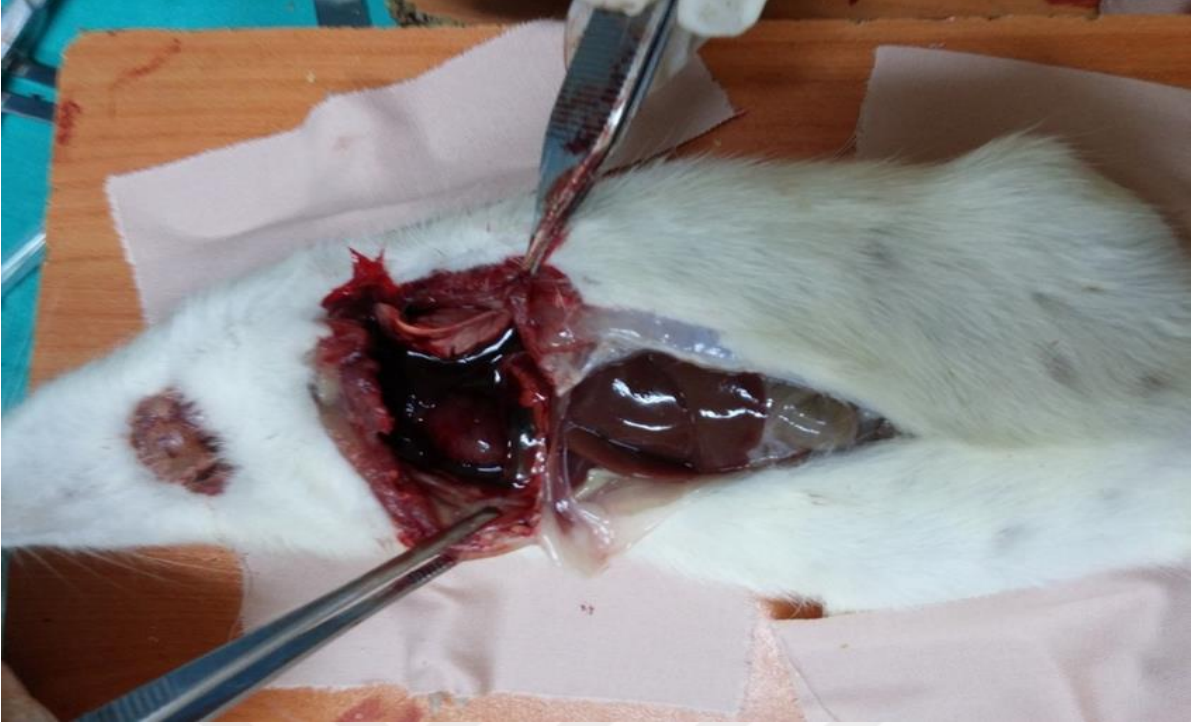


mg/kg/mL/gün) 7 gün süresince (günde 1 kez, 1 mL) verildikten sonra kalp İ/R oluşturulup ratlar deney sonunda sakrifiye edilerek kalp dokuları alındı.

Deney sonunda, çıkarılan kalp dokusu iki eşit parçaya bölünerek bir parçası formaldehit içerisinde histopatolojik analiz için, diğer parçası ise biyokimyasal parametrelerin analizi için uygun koşullarda saklandı. Histopatolojik değerlendirmeler KSÜ Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Patoloji Ana Bilim Dalında, biyokimyasal değerlendirmeler ise KSÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalında yapıldı.



**Resim 2:** Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-1



**Resim 3:** Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-2



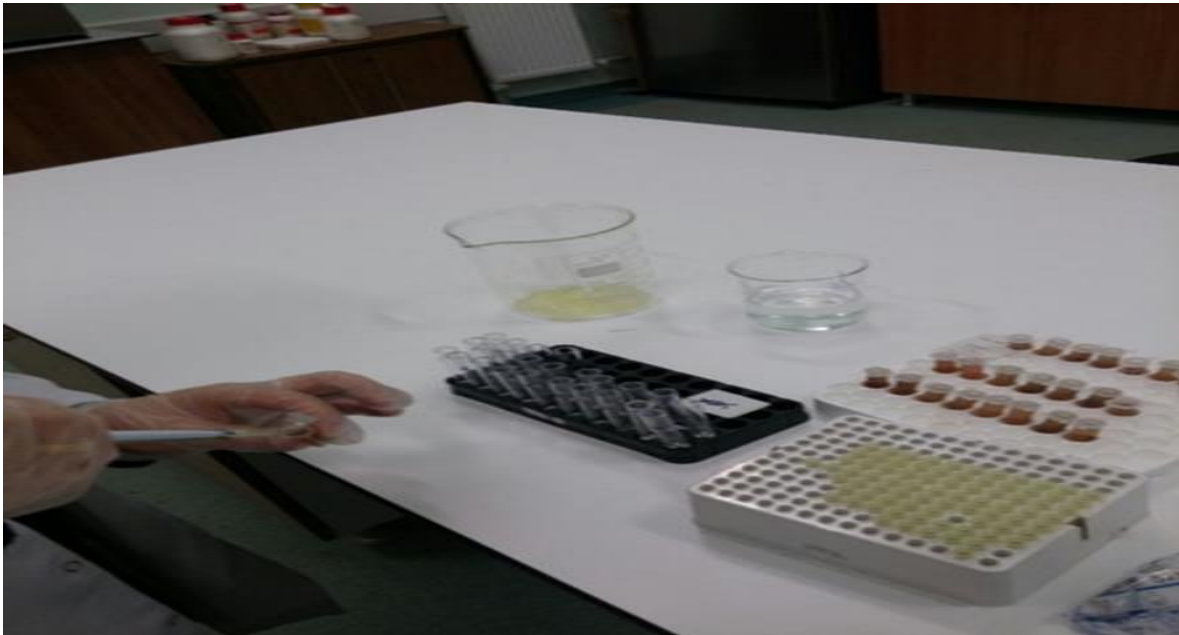
**Resim 4:** Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-3

### 3.6. Homojenat Hazırlama

Dokuları homojenize etme işlemine geçmeden öncelikle dokularımızı tartıp (Resim 5), sonrasında dokulara 1 g 9 hacim (hacim/ağırlık) %1,15 KCl çözünmesi amacıyla ilave edildi (Resim 6). Dokular 16000 devir/dakika hızda 3 dk süresince homojenize edildi (Resim 7). Enzim aktive kaybını engellemek için numuneler buzla dolu küvete yerleştirildi. Sonrasında homojenatlar +4 °C’de 14000xrpm’de 30 dk boyunca santrifüj edildi ve üstteki süpernatantlar alınıp ependorf tüplere ayrıldı. Bu ayrılan süpernatantlardan MDA ve protein düzeyleri ile CAT, SOD ve GPx enzim aktivite ölçümleri yapıldı (Resim 8).



**Resim 5:** Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-4



**Resim 6:** Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması



**Resim 7:** Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-6



**Resim 8:** Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-7



**Resim 9:** Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-8

### **3.7. ELISA Metodu ile GPER-1 Tayini ve Ayıraçlar**

Kalp dokusunda Rat G Protein Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER-1) düzeyi ticari bir kit ile (MyBiosource, catalog number: MBS095620, USA) ELISA tekniği ile ölçüldü. Çalışma yapılırken kitin içeriğinde bulunan yöntem prosedürü uygulandı (Resim 9).

#### **3.7.1. Kit içeriğinde bulunan ayıraçlar**

- 96'lık kaplamalı kuyucuk
- Standart (Liyofilize)
- Belirleme Reaktifi A (Green)
- A Reaktifi İçin Seyreltme Çözeltisi
- Belirleme Reaktifi B (Red)
- B Reaktifi için Seyreltme Çözeltisi
- TMB Substrat
- Yıkama Tamponu (Wash Buffer) ( 30 x konsantre)

Prensibi: Numunelerde GPER-1 seviyeleri kantitatif sandviç immünoassay tekniği (ELISA) ile ölçüldü. Mikrotitre plakası GPER-1'e has olan bir antikor ile daha önceden kaplandı. Standartlar ve numuneler sonrasında GPER-1'e has olan bir biyotin-konjuge antikor ile uygun bir mikro-titre plaka oyuklarına eklendi. Sonrasında avidin bağlı horseradish

peroksidaz (HRP) herbir mikropalakaya eklendi ve devamında inkübe edildi. TMB substrat çözeltisi GPER-1, biyotin-konjuge antikor ve enzim-konjüge avidin bulunduran kuyucuklara eklendikten sonra renk değişimi açığa çıktı. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit çözeltisi ilave edilerek bitirildi ve renk değişimi 450 nm olan bir dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Numunelerde GPER-1 konsantrasyonu, standart eğride numune O.D'lerin kıyaslanmasıyla belirlendi.

#### **Kit Prosedürü**

1. Tüm reaktifler, standartlar ve numuneler hazırlandı.
2. Standart ve numunelerden ilgili her kuyucuğa 100 µl ilave edildi. 1 saat 37°C'de inkübasyon işlemi uygulandı.
3. Aspirasyon işlemi gerçekleştirildi ve her kuyucuğa belirleme çözeltisi A'dan 100 µl ilave edildi. 1 saat 37°C'de inkübasyon işlemi uygulandı.
4. 3 kez aspirasyon ve yıkama işlemi uygulandı.
5. Aspirasyon işlemi uygulandı ve her kuyucuğa belirleme çözeltisi B'dan 100 µl ilave edildi. 30 dakika 37°C'de inkübasyon işlemi uygulandı.
6. 5 kez aspirasyon ve yıkama işlemine tabi tutuldu.
7. Her kuyucuğa 90 µl substrat solüsyonu ilave edildi. 15-25 dakika 37°C'de inkübasyon işlemine tabi tutuldu.
8. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu ilave edildi. 450 nm'de ise okuması yapıldı.

### **3.8. ELISA Metodu ile Nitrotirozin (3-NT) Düzeyi Tayini**

Kalp dokusunda Nitrotirozin (3-NT) düzeyi ticari bir kit ile (MyBiosource, catalog number: MBS023877, USA) ELISA tekniği ile ölçüldü.

### **3.9. NO (nitrit+nitrat) Düzeyi Tayini**

Cortas ve Wakid yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü (72).

#### **Gerekli Ayraçlar**

1. Kadmiyum granülleri: 0,1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde saklandığı sürece 9 ay stabildir.
2. Glisin-NaOH buffer: 7,5 g glisin bir miktar distile suda çözüldü. 2 mol/L NaOH çözeltisi ile pH'ı 9,7'ye ayarlandı. Bu çözelti 1 ay 0-8 °C'de stabildir.
3. Sülfanilamid: 5 g sülfanilamid 3 mol/L sıcak HCl içinde çözülür ve daha sonra soğumaya bırakıldı. 1 yıl oda sıcaklığında stabil kalabilir.

4. N-Naphthylethylene diamine (NNDA): 50 g NNDA 250 mL distile su içinde çözüldü. 2 ay 0-8 °C’de stabildir.

5. Çinko sulfat ( $ZnSO_4$ ): 75 mmol/L; 10,8 mg alınıp 500 mL’ye tamamlandı.

6. Bakır sulfat ( $CuSO_4$ ): 5 mmol/L; 250 mg alınıp 200 mL’ye tamamlandı.

7. Sodyum hidroksit (NaOH): 55 mmol/L; 1,1 g alınıp 500 mL’ye tamamlandı.

8. Standartlar:  $NaNO_2$  standartı 10 mmol/L’lik sodyum tetra borat çözeltisi içinde hazırlandı (69 mg  $NaNO_2$ , 380 mg borat ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ ) 100 mL içinde çözüldü).

9.  $KNO_3$  standardı: 102 mg potasyum nitrat alınıp 10 mmol’lik 100 mL sodyum tetra borat içinde çözüldü.

### DeneySEL İŞLEMLER

**Deproteinizasyon:** Test tüpüne 0,5 mL distile su, 2 mL  $ZnSO_4$ , 2,5 mL NaOH ilave edilip 10 dk. oda ısısında beklettikten sonra 4000 g’ de 20 dk. santrifüj edildi.

**Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu:** Granüller 3 defa distile su ile yıkanır. 1-2 dk. içinde  $CuSO_4$  içinde çalkalanarak bekletilip, 3 defa da Glisin-NaOH ile yıkanıp 10 dk. içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutuldu.

**Sonucun hesaplanması:**  $KNO_3$ ’ ün 10 milimolarlık çözeltisinden 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlanır ve numunelere uygulanan tüm işlemler standartlara da uygulandı.

1 mL glisin-NaOH buffer tüm tüplere konuldu. 1’er mL deproteinize numunelerden ve standartlardan alındı. 2,5 g tartılan ve aktivasyon işleminden geçirilen kadmiyumlardan tüm tüplerin üzerine konuldu. 90 dk. oda ısısında karıştırarak beklendi. Süre sonunda nitrit ölçümü için bu tüplerden 2’şer mL alınarak üzerine 1 mL sülfanilamid ve 1 mL NNDA ilave edildi. Karıştırılır ve 45 dk. beklendikten sonra 545 nm’de okuma yapıldı.

**Direkt nitrit ölçümü:**  $NaNO_2$  standartlarını 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlandı ve deproteinize numunelerden kadmiyum ile reaksiyona sokmadan direkt olarak 2’şer mL alınarak ayrı tüplere konuldu. Üzerine 1 mL sülfanilamid ve 1 mL NNDA eklendi. 45 dk. sonra 545 nm’de okuma yapıldı.

### **Nitrat aktivitesinin hesaplanması**

Bulunan nitrat değerlerinden nitrit değerleri çıkarıldıktan sonra sulandırma faktörü olan 20 ile çarpılıp yine nitrat standardından elde edilen faktör ile çarptıktan sonra çıkan sonuç milimol/litre olarak hesaplanmış olur (72).

### **3.10. Protein Düzeyinin Tayini**

Protein düzeyi tayini için Lowry metodu kullanıldı (73). Bu metot proteinlerin yapısındaki trozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungustik-fosfomolibdik asit ile verdiği renk tepkimesinin spektrofotometrik yöntemle 750 nm'deki absorpsiyon ölçümüne dayanır (73).

#### **Ayırıcılar**

##### **1. A çözeltisi:**

%2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 g hazırlanır.

0,1 N NaOH ile 100 mL'ye tamamlanır.

##### **2. B Çözeltisi: B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub> çözeltilerinden meydana gelir.**

###### **a) B<sub>1</sub> Çözeltisi:**

% 1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1 g hazırlanır.

Saf suyla 100 mL'ye tamamlanır.

###### **b) B<sub>2</sub> Çözeltisi:**

%2 Na-K tartarat 2 g hazırlanır.

Saf suyla 100 mL'ye tamamlanır.

##### **3. C Çözeltisi (Günlük hazırlanır)**

50 mL A + 1 mL B (0,5 mL B<sub>1</sub>+0,5 mL B<sub>2</sub>) karıştırılır.

##### **4. D Çözeltisi (Günlük hazırlanır)**

Folin Cioacaltea 1: 1,5 (v/v) oranında saf su ile sulandırılır.

#### **Standart Eğrinin Çizimi**

Stok standart için 0,3 g/dL bovin albumin oluşturulur. Oluşturulan stok standarttan 5 mL alınıp 100 mL'ye serum fizyolojik ile tamamlandığında 150 µg/mL konsantrasyon elde edilir. Bundan seri sulandırma ile 150, 120, 90, 60, 30 µg/mL' lik konsantrasyonlar oluşturulup 750 nm'de verdikleri absorpsiyonlar kaydedilir. Bu verilere göre konsantrasyon-absorpsiyon eğrisi çizilir. Her örnek ölçümünde standart eğri tekrarlanır (73) (Tablo 3).



**Tablo 3:** Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp no	Kör	1	2	3	4	5
Konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	30	60	90	120	150
Standart bovin albumin (mL)	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Serum fizyolojik (mL)	0,3	-	-	-	-	-
C Çözeltisi (mL)	3	3	3	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir.						
D Çözeltisi (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilip 750 nm’de köre karşı okunur.

### Doku Örnek Çalışması

Kalp dokularından hazırlanan süpernatantta protein tayininin yapılması için, süpernatant 1:50 oranında serum fizyolojik ile sulandırılıp protein tayini yapılır. Bunun için üç adet tüp alınır. Çözeltiler aşağıdaki şekilde tüplere yerleştirilir (Tablo 4).

**Tablo 4:** Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Serum fizyolojik	0,3	-	-
Standart	-	0,3	-
Süpernatant	-	-	0,3
C Çözeltisi	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir.			
D Çözeltisi	0,3	0,3	0,3

Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilip 750 nm’de köre karşı okunur.

### Hesaplanması

Doku numunesinin absorbanası standartın absorbanası ile kıyaslanarak ya da direkt olarak standart eğrisinden değerlendirilir ve dilüsyon katsayısı ile çarpılıp sonucu verilir (73).

### 3.11. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini

MDA tayininde Ohkawa yöntemi kullanıldı (74). Aerobik koşullarda pH 3,4’de tiyobarbitürik asit (TBA) ile numunenin 90-95°C’de inkübasyonu sonucu oluşan MDA’nın

TBA ile pembe renkli kompleks oluşturması temeline dayanır. Oluşan bu renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. 532 nm’de spektrofotometrik açıdan değerlendirilir (74).

### Ayıraçlar

#### 1. SDS %8,1’lik

Sodyum Dodesil Sulfat (SDS)

#### 2. Asetik Asit %20’lik (pH 3,5)

#### 3. N-Butanol/Piridin özeltisi (14/1)(v/v)

#### 4. Tiyobarbitürik Asit (TBA) %0,8’lik

#### 5. Stok Standart

tetramethoksiopropan (yoğunluk =0,99 g/mL)

### Standart Eğri izimi

Standart eğri çizimi oluşturulurken stok standarttan 6,6 µl alınıp 100 mL’ye saf suyla tamamlanıp günlük standart hazırlanıır. Sonrasında 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/mL konsantrasyonunda çalışma standartları oluşturulur. Ayıraçlar tüplere Tablo 5’te gösterildiği şekilde eklenir.

**Tablo 5:** MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tp No.	0 0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon(nmol/mL)		100	80	60	40	20	10
Standart(mL)	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
SDS (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Asetik Asit (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
TBA(mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Saf su (mL)	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Vorteksle karıştırılır. 60 dk 90 C°’de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.							
Saf su(mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
N-Butanol/Piridin	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Vorteksle karıştırılır. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir.							

Tüplere N-Butanol/Piridin ilavesinden sonra tüpler karıştırılır ve 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım (st faz) alınıp 532 nm’de absorbands fotometrik olarak okunur ve standart eğri grafiği çizilir.

Dokuda MDA düzeyini tayin etmek için örnek çalışması oluşturulurken de yukarıdaki tabloda verildiği şekilde tüpler belirli hacimlerde hazırlanıp doku örneği alınır ve MDA tayini yapılır. Ayrıntılı bilgi Tablo 6’de gösterilmiştir.

**Tablo 6:** Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Örnek	Standart	Kör
Homojenat(Örnek)	0,1 mL	-	-
Standart	-	0,1 mL	-
%8.1 SDS	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
%20 Asetik Asit	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
%0.8 TBA (sulu)	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Saf su (mL)	0,7 mL	0,7 mL	0,8 mL
Vorteksle karıştırılır. 60 dk 90 C°’de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.			
Saf su (mL)	1 mL	1 mL	1 mL
N-Butanol/Piridin (v:v 15/1 oranında)	5 mL	5 mL	5 mL

Tüplere N-Butanol/Piridin eklenmesinden sonra tüpler iyice karıştırılır. Sonrasında 4000 rpm’de 10 dakika süresince santrifüj edilir ve üstteki organik kısım (üst faz) alınıp 532 nm’de absorbans fotometrik olarak okunur. Sonuç standart eğriden değerlendirilir (74).

### Hesaplanması

nmol/mL olarak ölçülen MDA düzeyi nmol/mg protein olarak belirtilmiştir.

$$\text{MDA Düzeyi (nmol/mg protein)} = \frac{\text{MDA değeri (nmol/mL)}}{\text{protein (mg/mL)}}$$

$$\text{MDA Düzeyi (nmol/gr doku)} = \frac{\text{MDA değeri (nmol/mL)} \times \text{süpernatant (hacim/ağırlık)}}{\text{doku ağırlığı (g)}}$$

### 3.12. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD tayini için Fridovich yöntemi kullanıldı (75). SOD, oksidatif enerji üretimi esnasında açığa çıkan toksik süperoksit radikallerinin moleküler oksijen ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’ye

dismutasyonunu hızlandırır. Bu metod, ksantin ve XO kullanılarak açığa çıkarılan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (piyodonitrotetra zolium viyole: INT) ile oluşturduğu kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (O.D) okunması temeline dayanır. Numunede var olan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırıp 2 numaralı formazan tepkimesini inhibe etmektedir. Sonuç olarak açığa çıkan kırmızı rengin O.D'si SOD yokluğunda meydana gelen renge göre azalır ve aradaki farkın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülmüş olur (75).

### **Ayırdaçlar**

#### **1. CAPS Tamponu(3-sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) (pH:10,2)**

0,94 mM EDTA	0,035 g
50,00 mM CAPS	1,1065 g
Doymuş NaOH	11,1 µl
Saf suyla 100 mL'ye tamamlanır.	

#### **2. Substrat Karışımı**

INT	0,00253 g
0.05 mM Ksantin	0,00152 g
Bu karışım CAPS tamponu ile 100 mL'ye tamamlanır.	

#### **3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz**

50 Ü Ksantin oksidaz	3,04 µl
Saf suyla 1 mL'ye tamamlanır.	

#### **4. 0,01 M Fosfat tamponu (pH:7 ayarlanır)**

Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	54,91 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,58 mg

Saf suyla 100 mL 'ye tamamlanır.

#### **5. Standart (S6): 5,6 Ü/mL SOD içeren Ransod kitinin standartıdır.**

### **Standart Eğri Çizimi**

Liyofilize (hızlı dondurulmuş, steril, mikroorganizma içermeyen) şekilde hazırlanmış SOD standartı 10 mL bidistile suyla sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak diğer SOD derişimleri fosfat tamponu ile Tablo 7'de olduğu gibi hazırlanır. 2-8 °C'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanmaktadır.

**Tablo 7:** SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Kullanılacak Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	M Fosfat Tamponunun Hacmi	SOD derişimi (Ü/mL)
S5	6 mL S6	5 mL	2,8
S4	5 mL S5	5 mL	1,4
S3	5 mL S4	5 mL	0,7
S2	3 mL S3	5 mL	0,23

S1: Kör (fosfat tamponu)

Yöntemde; SOD'un aktivite tayini yapılırken, kalp doku hücrelerinden oluşturulan süpernatantlar %30 ile %60 arasında % inhibisyon aralığında 0,01 M fosfat tamponu ile 1:65 (640 mikrolitre tampon, 10 mikrolitre örnek) oranında sulandırılır ve devamında aktivite tayini yapılır (Tablo 8).

**Tablo 8:** SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı

	Kör (µl)	Standart(µl)
Standart	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır.		
Ksantin oksidaz	125	125

XO'nun ilavesinden sonra tekrardan karıştırılır. 30 saniye sonra çalışma körünün ve standardın 37 °C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı olan başlangıç absorbansları (A<sub>1</sub>) okunur. Aynı zamanda da kronometre çalıştırılıp 3 dakika sonra son absorbansları (A<sub>2</sub>) tekrardan okunur.

### Hesaplama

Çalışma körü SOD içermediğinden inhibisyona uğramamış olan bir tepkime olarak kabul edilir ve değeri %100 alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körü ile oranlanıp hesaplaması yapılır (Tablo 9).

$$A/\text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A / \text{dak. standart} \times 100}{\Delta A \text{ çalışma körü}}$$

$\Delta A$  çalışma körü

Yapılan hesaplamadan sonra X yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/mL) logoritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değeri yazılıp standart eğri oluşturulur.

**Tablo 9:** Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı

	<b>Kör (µl)</b>	<b>Standart(µl)</b>
Standart	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır.		
Ksantin oksidaz	125	125

Tüpler tekrardan karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37°C’de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbans (A<sub>1</sub>) okunur. 3 dakika sonra absorbans (A<sub>2</sub>) tekrar okunur.

#### **Hesaplama:**

$$\Delta A / \text{dak. standart} = A_2 - A_1 / 3 \text{ dakika}$$

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta A / \text{dak. standart} \times 100}{\Delta A \text{ çalışma körü}}$$

$\Delta A$  çalışma körü

Numuneye ait olarak hesaplanan yüzde inhibisyon değerine denk gelen SOD değeri standart eğri kullanılarak bulunmaktadır. Ü/mL biriminden ölçülen SOD aktivitesi Ü/mg protein birimi olarak belirtilmiştir (75).

$$\text{SOD spesifik aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{SOD aktivitesi (Ü/mL)}}{\text{Protein (mg/mL)}}$$

### **3.13. Glutatyon Peroksidaz (GPx) Aktivite Tayini**

GPx aktivitesi süpernatantta Beutler yöntemi ile belirlenmiştir (76). Aşağıda belirtilen reaktifler tabloda (Tablo 10) gösterilen oranlarda tüplere eklenir ve tüpler 37°C’de 10 dakika boyunca inkibasyona bırakılır (76).

### Kullanılan Reaktifler

1. 1 M Tris-HCl (8,8 g), 5 mM EDTA Tamponu (0,1861 g) (pH:8)
2. 0,1 M GSH (glutasyon) 1,537 g - 50 mL distile suda
3. 10 Ü/mL GR (glütasyon redüktaz) (günlük hazırlanır) 50µl -1mL distile suda
4. 2 mM NADPH 0,1666 g 100 mL'ye tamamlanır.
5. 7 mM t-butil hidroperoksit (günlük hazırlanır)

**Tablo 10:** Doku örneğinde GPx tayini için deney tüplerinin hazırlanışı

Reaktifler	Örnek(ml)
1M Tris-EDTA	0,1 (100 µl)
Glutasyon	0,02 (20 µl)
Glutasyon redüktaz	0,1
NADPH	0,1
Örnek (homojenat veya hemolizat)	0,01 (10 µl)
Distile su	0,66 (660 µl)
37°C' de 10 dakika inkübasyon yapılır.	
t-bütillidroperoksit	0,01
Kinetik olarak 340 nm'de 2,5 dakika, optik dansitedeki azalma kaydedilmektedir.	

İnkübasyon sonrasında numuneler 1 cm kuvars küvete koyulup üzerine 10 µl 7 mM t-bütillidroperoksit eklendikten sonra okuma başlatılır. Bu reaksiyon, 37°C'de enzim tarafından oksitlenen 1 µmol NADPH'ın 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde O.D'deki azalmayı kinetik olarak 2,5 dakika boyunca okur.

### Hesaplama

$$\text{GPx Aktivitesi (Ü/mL)} = \frac{\Delta\text{O.D} \times V_T (1,0 \text{ mL})}{6,22 \times V_H (0,01 \text{ mL})}$$

$\Delta\text{OD}$ : Dakikadaki O.D değişimi (O.D farkı)

$V_H$ : Örnek hacmi

$V_T$ : Toplam hacmi

6,22: 2mM NADPH yıkım hızının verdiği O.D değeridir.

Ü/mL biriminden ölçülen GPx aktivitesi numunede belirlenen protein değerine bölünerek enzim spesifik aktivitesi sonucu Ü/mg protein biriminden verilir (76).

$$\text{GPx Spesifik Aktivitesi (Ü/mg protein)} = \frac{\text{GPx Değeri(Ü/mg)}}{\text{Protein (mg/mL)}}$$

### 3.14. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

CAT aktivitesi süpernatantta Beutler yöntemi ile belirlenmiştir (76). CAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yıkımını katalizler. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin CAT tarafından yıkılma hızı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden faydalanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (76).

#### Ayırıcılar

#### 1. 1 M Tris-HCl, 5mM Na<sub>2</sub> EDTA tamponu, pH 8,0

Tris-Baz	5,358 g
Tris-HCl	8,787 g
Na <sub>2</sub> EDTA	0,1461 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

#### 2. 1 M Fosfat tamponu, pH 7,0

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,723 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,344 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

#### 3. 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

%30' luk peroksitten 10 µl alınır ve 9,990 µl saf suyla tamamlanır.

#### 4. Etanol (%95'lik)

#### Yöntem

CAT aktivitesinin tayini için, doku süpernatantı 1:50 oranında saf suyla sulandırılır, 1 mL'sine 20 µl saf etanol eklenip karıştırılır ve aktivite tayini olana kadar tüplerin ağzı kapalı olarak bekletilir. Deneye başlamadan, günlük olarak hazırlanan 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonunun doğru olarak ayarlanıp ayarlanmadığı fosfat tamponuyla kontrol edilir. Bunun işlem için fosfat tamponu 1:10 oranında saf suyla sulandırılabilir. Ayarlanması yapılırken de 1 mL'lik küvete 900 µl saf su 100 µl fosfat tamponu eklenip karıştırılır ve bu karışımın 900 µl'si 230 nm'de fotometrik olarak okunur ve OD<sub>1</sub> olarak kayıt altına alınır. Sonrasında aynı küvete hazırladığımız 10 mM 'lık peroksitten (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 100 µl ilave edilip tekrardan okuma yapıp absorbans değeri OD<sub>2</sub> şeklinde kaydedilir. OD<sub>2</sub>-OD<sub>1</sub>= 0,071



olmalıdır ve bu değer elde edildikten sonra oluşturulan peroksidin konsatrasyonu tam 10 mM'dir denilir ve sonrasında deneye aşağıda belirtildiği şekilde başlanır.

**Tablo 11:** Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars kvetlerinin hazırlanışı

	Kr (μl)	Numune (μl)
1 M Tris-HCl, 5 mM Na <sub>2</sub> EDTA tamponu, pH 8,0	50	50
10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	900
Saf su	930	30
37°C'de 10 dakika inkübe edilir.		
rnek (sulandırılmış)	20	20

Tüpler 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra öncesinden 1:50 oranında seyrettiğimiz numuneden 20 μl alınıp tüplere konur ve 230 nm'de 2,5 dakika süresince kinetik okuma yapılır. Her rnek teker teker çalışılıp kaydedilir (Tablo 11).

#### Hesaplama

$$\text{CAT Aktivitesi (/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1,0 \text{ mL})}{0,071 \times V_H (0,02 \text{ mL})}$$

ΔOD: Dakikadaki O.D değişimi

VH: rnek hacmi

VT: Toplam hacim

0,071: 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yıkım hızının verdiği OD değeridir.

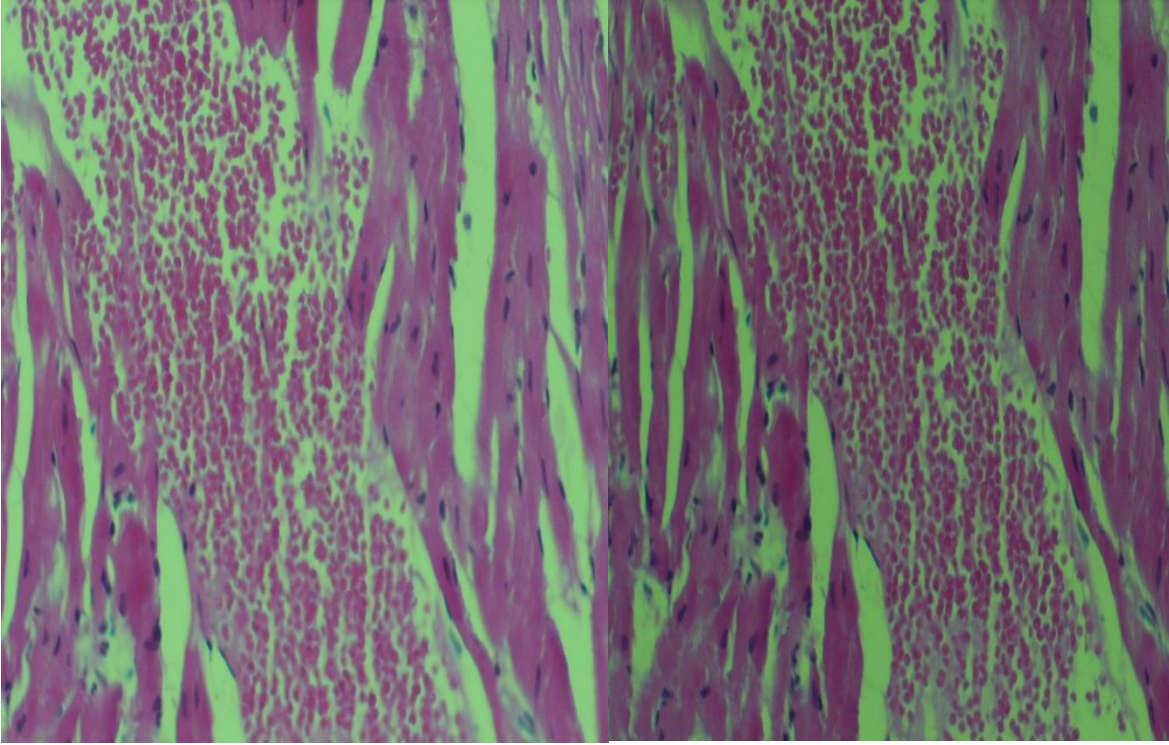
/mL biriminden llen CAT aktivitesi numunede gözlenen protein değerine bölünerek dokudaki enzim spesifik aktivitesinin sonucu /mg protein biriminden verilir (76).

$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi (/mg protein)} = \frac{\text{CAT Değeri (/mL)}}{\text{Protein (mg/mL)}}$$

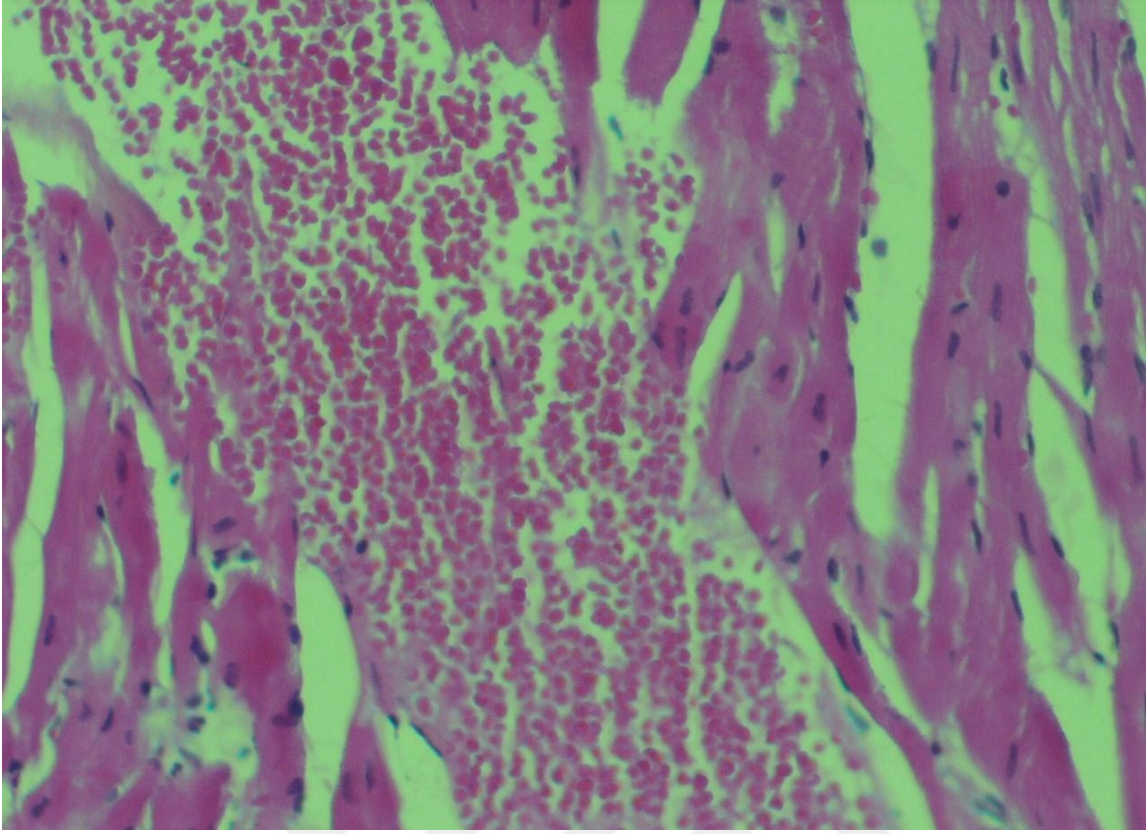
### 3.15. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik inceleme yapılabilmesi için, dokular % 10'luk tamponlu nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Örneklerin tamamı doku takip cihazında rutin

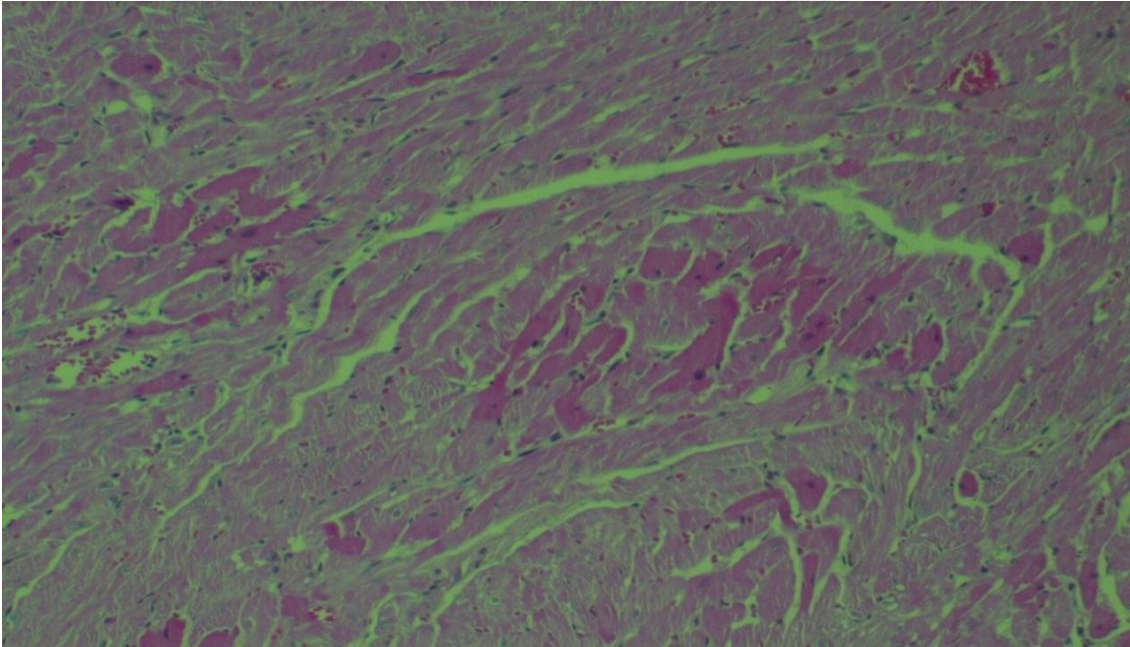
takibe alınıp parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan mikrotom cihazı ile her doku örneği için 5 µ'luk seri kesitler hazırlanarak Hematoksilen-Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Çalışma, aynı patolog tarafından hangi doku örneğinin hangi gruba dahil olduğunu bilmeden ve doku örnekleri arasından rastgele seçim yapılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile histopatolojik olarak incelendi. Gruplar; hemoraji (Resim 10), miyokardiyal ödem (Resim 11), myositolizis (Resim 12) ve PMNL infiltrasyonuna (Resim 13) göre değerlendirildi.



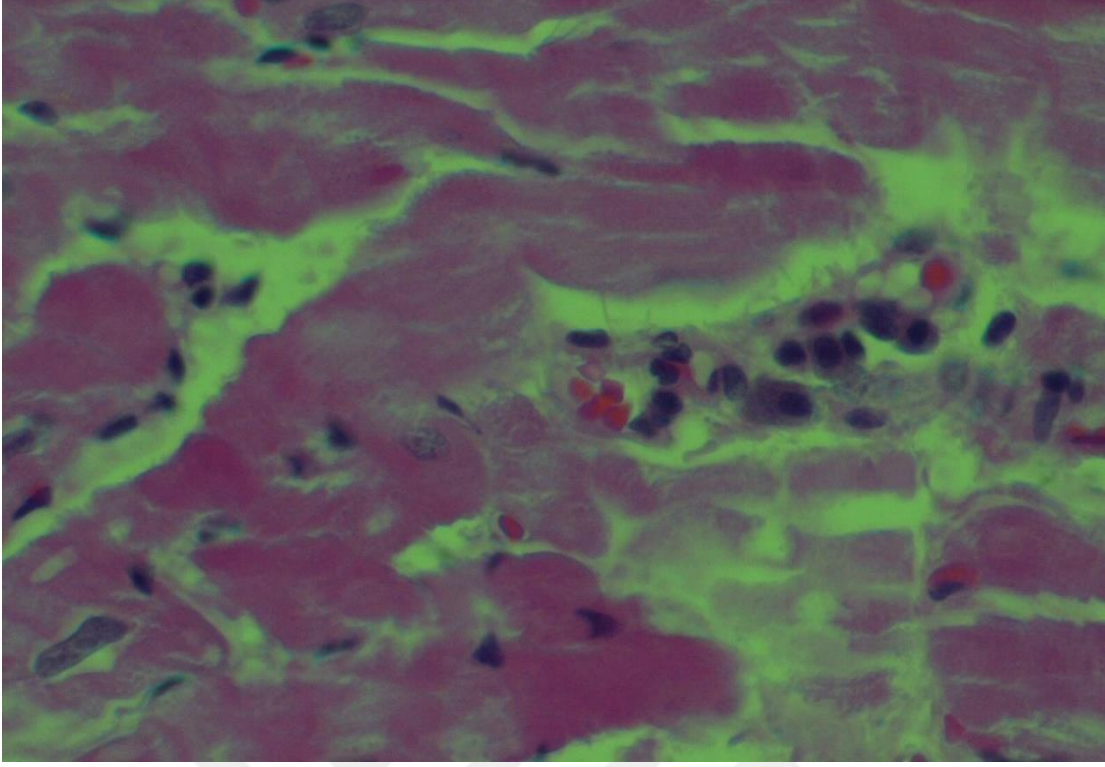
**Resim 10:** Miyokard hemoraji



**Resim 11:** Miyokard ödem ve kanama



**Resim 12:** Miyositolizis ve hipereozinofili



**Resim 13:** PMNL infiltrasyonu

### **3.16. İstatistik**

İstatiksel analizin yapılmasında SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 programı kullanıldı. Sonuçlarımız ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Biyokimyasal verilerimizin değerlendirilmesinde grupların arasındaki farkların incelenmesi için Non Parametrik Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Her iki test içinde  $p < 0,05$  değeri istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

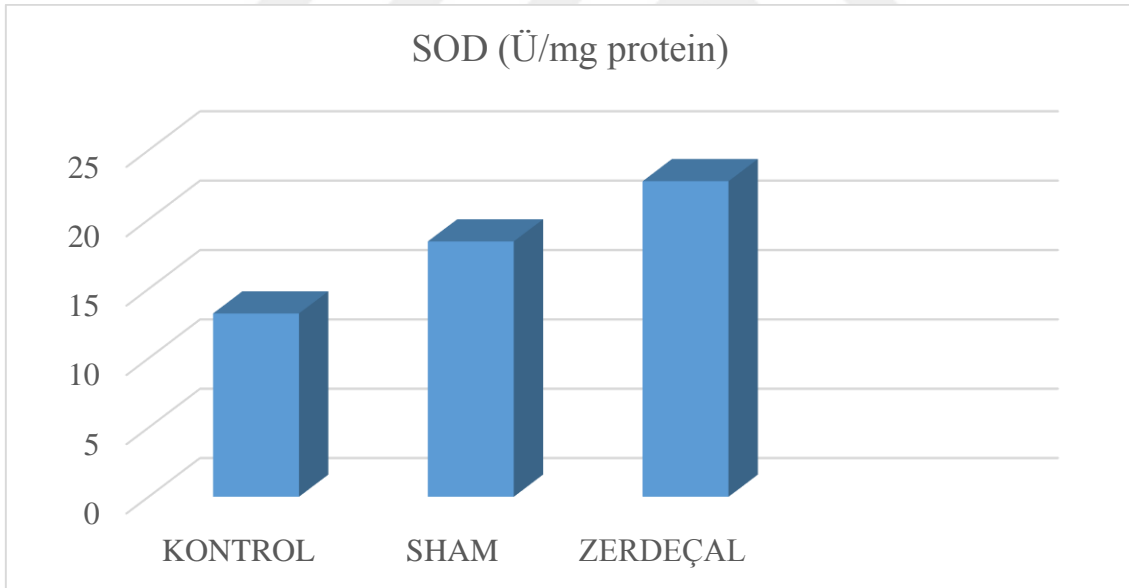
## 4. BULGULAR

### 4.1. Kalp Dokusundaki SOD Aktiviteleri

Gruplar arasındaki SOD düzeyleri kıyaslandığında; Kontrol grubu ile sham ve tedavi grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p: 0,001) (Tablo 12) (Şekil 17).

**Tablo 12:** Gruplar arası SOD bulguları

	n	SOD (Ü/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (KONTROL)	8	13,23±5,18	8,05-18,41
GRUP 2 (SHAM)	8	18,42±4,26	14,16-22,68
GRUP 3 (ZERDEÇAL)	8	22,76±7,88	14,88-30,64



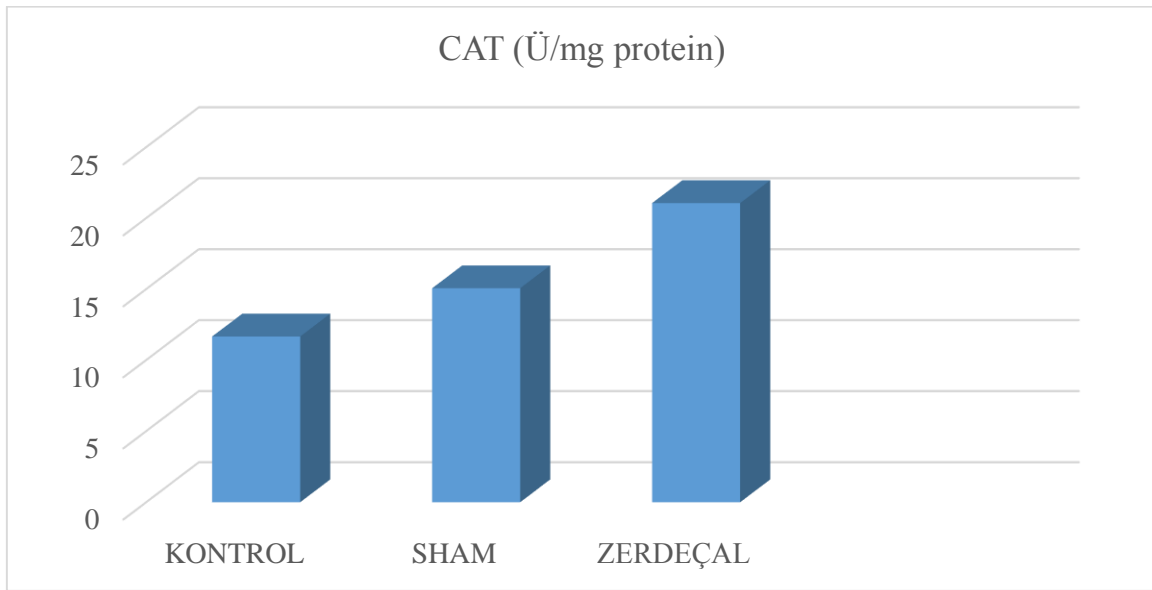
**Şekil 17:** Gruplar arası SOD düzeyleri

### 4.2. Kalp Dokusundaki CAT Aktiviteleri

Gruplar arasındaki CAT düzeyleri kıyaslandığında; Kontrol grubu, sham ve tedavi grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p: 0,001) (Tablo 13) (Şekil 18).

**Tablo 13:** Gruplar arası CAT bulguları

	n	CAT (Ü/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (KONTROL)	8	11,66±3,95	7,71-15,61
GRUP 2 (SHAM)	8	15,06±5,47	9,59-20,53
GRUP 3 (ZERDEÇAL)	8	21,06±8,76	12,29-29,82



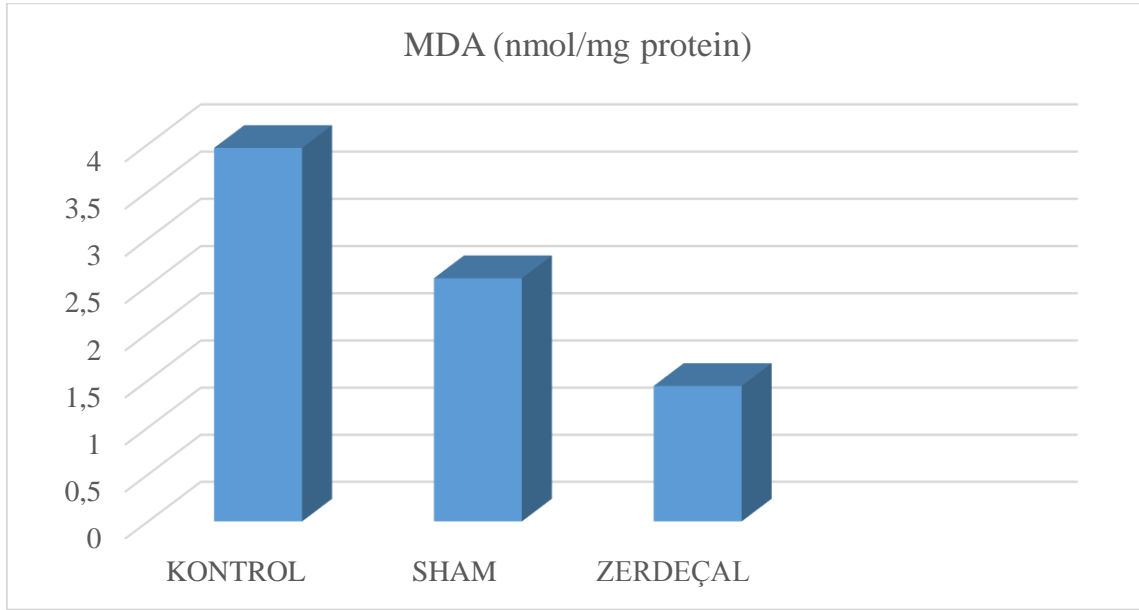
**Şekil 18:** Gruplar arası CAT düzeyleri

#### 4.3. Kalp Dokusundaki MDA Aktiviteleri

Gruplar arasındaki MDA düzeyleri kıyaslandığında; Kontrol grubu, sham ve tedavi grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p: 0,001) (Tablo 14) (Şekil 19).

**Tablo 14:** Gruplar arası MDA bulguları

	n	MDA (nmol/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (KONTROL)	8	3,96±1,27	2,69-5,23
GRUP 2 (SHAM)	8	2,58±1,04	1,54-3,62
GRUP 3 (ZERDEÇAL)	8	1,44±0,95	0,49-2,38



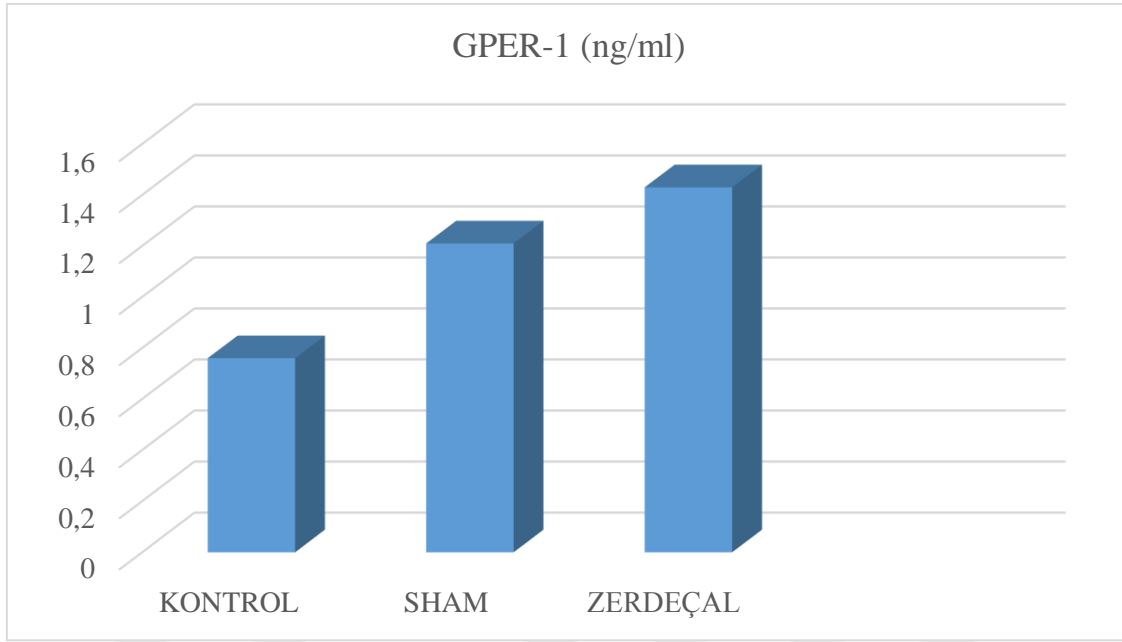
**Şekil 19:** Gruplar arası MDA düzeyleri

#### 4.4. Kalp Dokusundaki GPER-1 Aktiviteleri

Gruplar arasındaki GPER-1 düzeyleri kıyaslandığında; Kontrol grubu ile sham ve tedavi grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p: 0,011). Sham ile tedavi grubu arasında GPER-1 açısından farklılıklar gözlenmedi (p:0,518) (Tablo 15) (Şekil 20).

**Tablo 15:** Gruplar arası GPER-1 bulguları

	<b>n</b>	<b>GPER-1 (ng/ml)</b>	
		<b>Ort ± SD</b>	<b>Min-Max</b>
GRUP 1 (KONTROL)	8	0,76±0,01	0,75-0,77
GRUP 2 (SHAM)	8	1,21±0,08	1,13-1,29
GRUP 3 (ZERDEÇAL)	8	1,43±0,06	1,36-1,49



**Şekil 20:** Gruplar arası GPER-1 düzeyleri

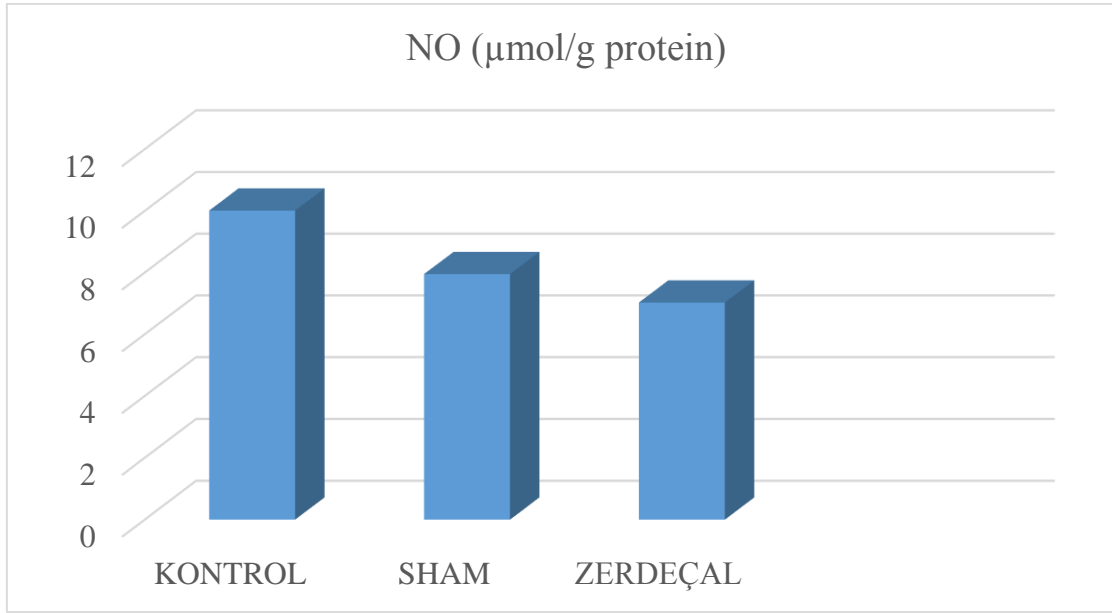
#### 4.5. Kalp Dokusundaki NO Aktiviteleri

Gruplar arasındaki NO düzeyleri kıyaslandığında; Kontrol grubu ile sham ve tedavi grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p: 0,001). Sham ile tedavi grubu arasında NO açısından farklılıklar gözlenmedi (p:0,244) (Tablo 16) (Şekil 21).

**Tablo 16:** Gruplar arası NO bulguları

	n	NO (µmol/g protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (KONTROL)	8	10,01±4,05	5,96-14,05
GRUP 2 (SHAM)	8	7,95±2,73	5,22-10,68
GRUP 3 (ZERDEÇAL)	8	7,03±1,50	5,53-8,53





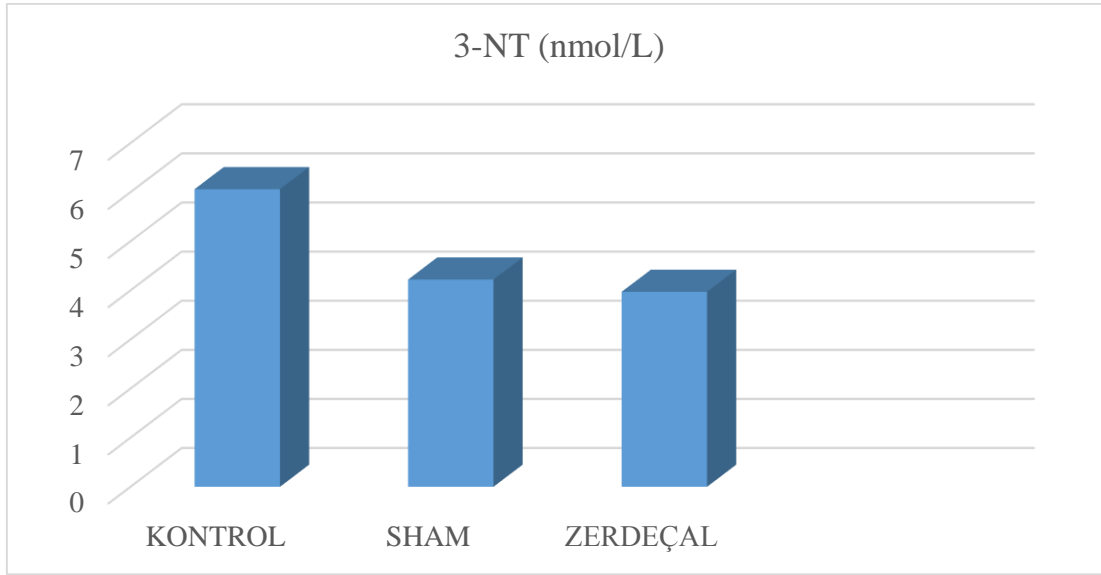
**Şekil 21:** Gruplar arası NO düzeyleri

#### 4.6. Kalp Dokusundaki 3-NT Aktiviteleri

Gruplar arasındaki 3-NT düzeyleri kıyaslandığında; Kontrol grubu ile sham ve tedavi grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p: 0,023). Sham ile tedavi grubu arasında 3-NT açısından farklılıklar gözlenmedi (p:0,622) (Tablo 17) (Şekil 22).

**Tablo 17:** Gruplar arası 3-NT bulguları

	n	3-NT (nmol/L)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (KONTROL)	8	6,06±1,15	4,91-7,20
GRUP 2 (SHAM)	8	4,22±0,16	4,06-4,38
GRUP 3 (ZERDEÇAL)	8	3,97±0,11	3,86-4,08



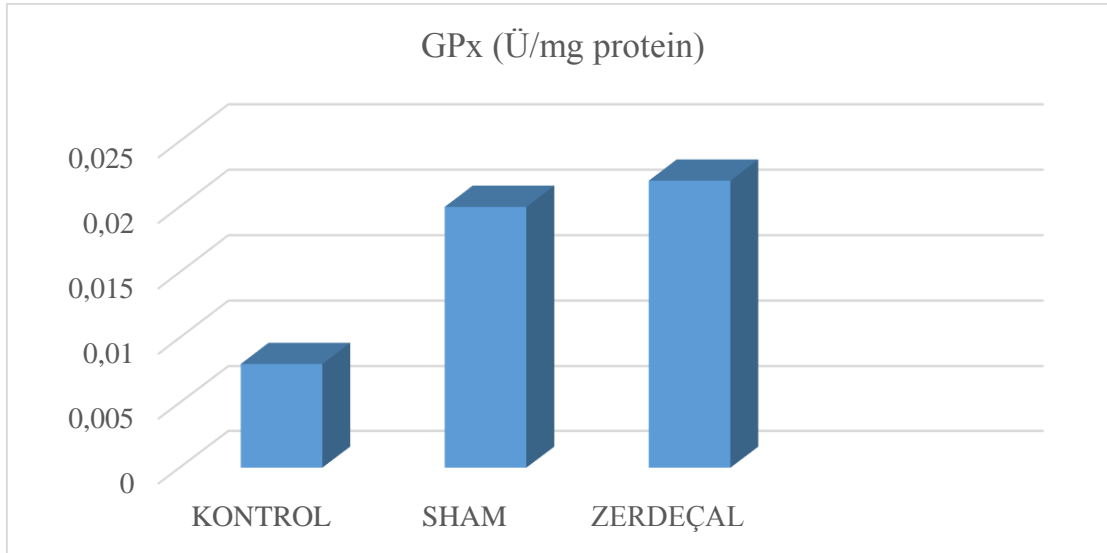
**Şekil 22:** Gruplar arası 3-NT düzeyleri

#### 4.7. Kalp Dokusundaki GPx Aktiviteleri

Gruplar arasındaki GPx düzeyleri kıyaslandığında; Kontrol grubu ile sham ve tedavi grupları anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Kontrol grubunda GPx aktivitesi sham ve tedavi grubuna göre anlamlı şekilde düştüğü saptandı (p:0,001). Sham ve tedavi grubu arasında anlamlı farklılıklar gözlenmedi (p:0,734) (Tablo 18) (Şekil 23).

**Tablo 18:** Gruplar arası GPx bulguları

	n	GPx (Ü/mg protein)	
		Ort ± SD	Min-Max
GRUP 1 (KONTROL)	8	0,008±0,002	0,006-0,01
GRUP 2 (SHAM)	8	0,020±0,008	0,012-0,028
GRUP 3 (ZERDEÇAL)	8	0,022±0,009	0,013-0,031



**Şekil 23:** Gruplar arası GPx düzeyleri

#### 4.8. Histopatolojik Bulgular

İ/R ve İ/R+SF grubunda; miyokardiyal ödem ( $p=0,205$ ), miyositolizis ( $p=0,412$ ), hemoraji ( $p=0,326$ ), PMNL infiltrasyonu ( $p=0,014$ ) izlendi. İstatistiksel olarak anlamlı fark sadece PMNL infiltrasyonunda bulundu (MannWhitney U Testi). Tedavi grubu İ/R ve İ/R+SF gruplarıyla karşılaştırıldığında; miyokardiyal ödem ( $p=0,025$ ), miyositolizis ( $p=0,039$ ), hemoraji ( $p=0,516$ ) ve PMNL infiltrasyonu ( $p=0,008$ ) izlendi. İstatistiksel olarak hemoraji, miyokardiyal ödem, miyositolizis ve PMNL infiltrasyonu yönlerinden anlamlı farklılıklar bulundu (Mann Whitney U Testi) (Tablo 19).

**Tablo 19:** Grupların histopatolojik derecelendirilmesi

	Miyokard ödem	Miyositolizis	Hemoraji	PMNL infiltrasyonu
İ/R	1	1	2	3
İ/R+SF	1	1	1	2
Tedavi	0	0	1	0

0-yok, 1-hafif, 2-orta 3-şiddetli olarak değerlendirildi.

## 5. TARTIŞMA

İlk defa yapılan bu çalışmada, kalp İ/R hasarında zerdeçalın GPER-1 ve oksidatif/nitrozatif stres biyomarkırları üzerine etkisi araştırılmıştır. Zerdeçal yapısal olarak antioksidan özelliğinden dolayı birçok hastalıkta tedavi etmek amacıyla deneysel olarak incelenmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada ise zerdeçalın kalp İ/R hasarında GPER-1 ve oksidatif/nitrozatif stres üzerine önemli rol oynayabileceğini ön görmekteyiz.

İskemi, bir organa gelen kan akımının farklı sebeplerden dolayı yetersiz duruma gelmesi ya da durmasıdır. Reperfüzyon ise iskemiye sebep olan etkenin ortadan kaldırılıp dokuya kan akımının tekrardan sağlanmasıdır (14). Miyokardial reperfüzyon hasarı, uzun süren iskemiye takiben reperfüzyon esnasında oluşan hasardır.

Curcumin, yemeklerde sarı renk veren baharat olarak da kullanılan zerdeçal (hind safranı)'ın yapısında bulunur ve tropikal bitki olan *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*)'nın sarı tozundan üretilir. Zerdeçal, doğu toplumlarında özellikle Çin ve Hint geleneksel tıbbında lokal/topikal ve genel kullanım görmüş cilt, mide-bağırsak hastalıkları ile yara iyileşmesinde kullanılmıştır. Aynı zamanda yapılmış olan epidemiyolojik, klinik ve hayvan çalışmalarıyla zerdeçalın birçok biyolojik etkisiyle moleküler mekanizmaları açıklanmaya çalışılmıştır. Antioksidan, antimikrobia, antimutajenik, antiinflamatuvar, yara iyileştirici, antikarsinojenik, nöro koruyucu, antimetazatik, angiogenezisi düzenleyici birçok özelliği ispatlanmış olup doz aşımında toksik özellik göstermeyen doğal bir maddedir (77). Literatür taramalarında benzer bir çalışmayla karşılaşmadığımızdan, zerdeçalın antioksidan, antiinflamatuvar ve yara iyileşmesini hızlandırıcı özelliklerinden dolayı kalp İ/R hasarında iyileştirici etkiye sahip olabileceğini düşündük. Bu amaçla deneysel olarak ratlarda oluşturduğumuz kalp iskemi modelinde zerdeçalın olumlu etkilerinin olup olmadığını histokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirdik.

GPER-1, yeni tanımlanan östrojen reseptörü analogudur. GPER-1'in stimülasyonu adenilat siklaz/cAMP yolağını kullanıp da oluşmaktadır (40). Literatür taramalarında İ/R hasarında GPER-1 ile ilgili hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu yüzden sonuçlarımızı herhangi bir çalışma ile karşılaştıramadık. Çalışmamızda GPER-1 düzeyi İ/R hasarında belirgin bir şekilde düşerken tedavi grubunda oldukça artmıştır. Kanımızca GPER-1'in İ/R hasarına bağlı olarak düşmesi östrojen düzeyinin artışından kaynaklanabilir. Dolayısıyla, tedavi grubunda GPER-1 düzeyinin artması zerdeçal bitkisinin östrojenik aktivitesinin olabileceğini göstermektedir.

İskemik dokuda kan akımının tekrardan başlamasıyla, özellikle dokuya gelen ve yerleşen PMNL tarafından ortama salınan SOR dokudaki yıkımı artırıcı etkidedir. İ/R hasarı birçok patofizyolojik süreç içeren karmaşık bir süreçtir. Çeşitli çalışmalar SOR'un İ/R hasarında lipit peroksidasyonunu başlatıp hasar oluşmasında önemli rolde olduğunu açığa çıkardı (39). Aynı zamanda SOR canlıdaki biyomoleküllerle tepkimeye girip dokudaki hasarı artırır (30). Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda; enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalar ile SOR'ların etkilerini yok eden maddelerin işlevleri deneysel ve klinik olarak belirtilmiştir.

SOR oluşumunu ve bunların oluşturduğu hasarı engellemek için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar "Antioksidan savunma sistemleri" olarak bilinmektedir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyip ve/veya SOR toplayarak lipit peroksidasyonunu inhibe eder (11). Bütün organizmaların savunma mekanizmasında etkili olan antioksidan enzimlere; CAT, SOD, GPx ve kimyasal bileşiklere de; askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol, karatenoid örnek verilebilir. Antioksidan savunmada öncelikli etkili olan enzimatik antioksidanlardır (78). CAT, SOD, GPx çok önemli olan antioksidan savunma mekanizmalarıdır. Bu enzimler düzenli hücre metabolizmasının kontrolünde çok önemlidir (36). Enzimatik antioksidanlar kadar değilse de bitkisel kaynaklı olan antioksidanların da oksidatif hasara karşı koruyucu etkide olduğu bilinmektedir (79). Antioksidan savunmada öncelikli etkiye sahip olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar CAT, SOD, GPx ve GR gibi enzimlerdir (4, 5). SOD, süperoksit radikalini  $H_2O_2$ 'ye katalizler.  $H_2O_2$  de GPx ve CAT tarafından moleküler oksijene ve suya indirgenir. GPx, GR aracılığıyla açığa çıkan glutasyonu okside forma dönüştürür. Bu sebepten ötürü bu enzimlerin konsantrasyonlarının ölçümü bize iskemi sonucunda meydana gelen SOR hakkında bilgi sağlar (30, 80). Bu araştırmada açığa çıkan oksidan hasarın derecesini belirlemek için ve verilen maddelerin hasarı engellemedeki başarısını görebilmek için CAT, SOD, MDA ve GPx enzim aktiviteleri çalışıldı. Hücrede meydana gelen serbest radikal hasarına karşı enzimatik ve non-enzimatik savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Ürik asit, A, C ve E vitaminleri, glutasyon nonenzimatik savunma mekanizmaları arasında önemli derecede yer alırken; CAT, SOD ve GPx enzimleri de hücre içinde işlev gören enzimatik savunma sistemleri yani radikal süpürücü olan enzimlerdir. Bunlar SOR'un meydana getirdiği oksidatif hasarı engeller.

Serbest radikal oluşum hızı bu radikalleri etkisizleştirme hızıyla eşit olduğu müddetçe oluşan radikallerden organizma etkilenmez. Aksi takdirde antioksidan savunma azalır veya zararlı bileşiklerin oluşma hızı organizmanın savunma gücünü aşarsa bu denge bozulur ve SOR'lara bağlı olarak zararlı etkiler meydana gelir. Antioksidan ajanlar birlikte kullanıldığı

zaman da birbirlerinin etkilerini olumlu yönde artırıp daha güçlü bir koruma sağlayabilir, oluşabilecek yan etkilerde de azalma meydana getirebilirler (30).

Yapılan çalışmalarda iskemide oluşan SOR'un miyokardiyal reperfüzyon hasarında rol oynadıkları, SOD ve CAT uygulamasıyla bu hasarın azaltılabileceği tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar, tam kan reperfüzyonundaki PMNL de bu hasarın oluşmasında önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (81).

Organizma çeşitli kaynaklardan gelen serbest radikallere maruz kalınması sonucu birçok savunma mekanizmaları geliştirir. Serbest radikallerle indüklenen oksidatif/nitrozatif stres ile ilgili savunma mekanizmaları: bu mekanizmaların engellenmesi, onarım mekanizması, fiziksel savunma ve antioksidan savunmadır. Enzimatik antioksidan savunma kaynakları SOD, GPx ve CAT'ı kapsamaktadır. Normal koşullar altında bu antioksidanların hücre içi düzeyi ve etkinlikleri arasında denge bulunmaktadır. Bu denge organizmanın canlılığı ve sağlığı açısından gereklidir. Antioksidanlar, günümüzde içinde buldukları besinler, yaygın kullanım özellikleri ve koroner kalp hastalığı koruma ve tedavisindeki yeri sebebiyle ilgi çekmeye devam etmektedir. Antioksidanlar, içinde bulunduğu bir ortamda, okside edilebilen bir maddeye göre daha az bulunmasına rağmen, o maddenin oksidasyonunu önleyen veya geciktiren madde olarak tanımlanabilir. Antioksidanlar fizyolojik rolü, kimyasal reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerin dokuya zararını önlemektir (16).

İntestinal, böbrek ve karaciğer İ/R ile aortik İ/R'nin indüklediği böbrek hasarında SOD aktivitesinin düştüğü birçok araştırmacılar tarafında rapor edilmiştir (82). Bizim çalışmamızda da sadece İ/R uygulanan grupta SOD aktivitesinde belirgin bir azalmanın olması; İ/R hasarının hücre içinde superoksit anyon radikallerini arttırdığı ve SOD enziminin inhibisyonuna neden olduğunu düşündürmektedir. Buna ek olarak, çalışmamızda İ/R hasarına karşı zerdeçal tedavisi verilen grupta SOD enzim aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Zerdeçalın hücre içinde superoksit anyon radikalının düzeyini azaltarak SOD aktivitesini artırdığı düşünülmektedir.

CAT enzimi, SOD tarafından oluşturulan  $H_2O_2$ 'yi peroksizomlarda su ve oksijene çevirir. CAT vücutta doğal olarak oluşan bir metalloproteindir ve in vivo olarak SOD ile kombine bir şekilde etki eder. Nitekim, çalışmamızda CAT aktivitelerinde sadece İ/R uygulanan grupta anlamlı derecede azalmıştır. İ/R hücre içerisinde yüksek oranda üretilen  $H_2O_2$ 'nin CAT'ın aktivitesini azalttığı düşünülmektedir. Dolayısıyla SOD ve CAT'ın kombine etkisi göze çarpmaktadır. Tedavi grubunda zerdeçal tedavisinin koruyucu etkisi ile CAT aktivitesinin arttığı düşünülmektedir (16).

MDA, lipid peroksidasyonunda bir son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede kullanılır. Çalışmamızda tedavi almamış sadece İ/R uyguladığımız kontrol grubunda MDA düzeyleri, sham ve tedavi gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Kalp İ/R gerçekleştirilmiş sıçanlarda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeylerinde önemli bir artışın ortaya çıktığı, artan MDA düzeylerine paralel olarak kalp İ/R'nin sıçanlarda kardiyak nekrozla sonuçlandığı gösterilmiştir (83).

GPx iyi bilinen doğal bir antioksidandır. Birbirinin aynı dört alt ünitelerden oluşan tetramerik bir enzimdir. Her subünit bir selenyum atomu içerir. Bu nedenle hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür. GPx, organik peroksitleri indirgenmiş GSH ile elimine eder. GPx toksik hidroperoksitlerin alkol ve suya indirgenmesini GSH'nun GSH disülfid (GSSG) oksidasyonu ile meydana getirir. GPx'in hücredeki dağılımı, GSSG-R'a bağımlıdır. Her iki enzim de sitozolde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Çalışmamızda bulduğumuz azalmış GPx aktivitesini içeriğindeki Se element düzeyinin miktarında İ/R'na bağlı oluşabilecek düşüğe bağlayabiliriz. Se düşüklüğünün, makromoleküllerden önce GPx enzim aktivitesini etkilemiş olabileceğini düşünülmektedir. Bu düşüncemizi destekleyen çalışmalar da mevcuttur (84).

İskemi, damar endotelinde hem inflamatuvar hücre infiltrasyonu hem de indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesini artırır. Böylece iskemi sırasında NO seviyesi artarken, reperfüzyon sürecinde kan akımının yeniden başlamasıyla, büyük miktarlarda moleküler oksijen dokulara taşınır. Reperfüzyon hasarından sorumlu olduğu düşünülen çok miktarda SOR ve  $O_2^-$  ortaya çıkar. İskemi sırasında oluşan aşırı miktardaki NO, ya bu radikalın stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrata dönüşür, ya da  $O_2^-$  radikali ile reaksiyona girerek bir toksik oksijen metaboliti olan peroksinitriti oluşturur. Peroksinitrit ise dokularda hasar yapar. NO artışındaki bir diğer muhtemel mekanizma ise, nötrofillerin aktivasyonu ve etkilenen dokuya sekresyonudur. Yapılan birçok araştırmada, İ/R'a bağlı olarak yüksek miktarda meydana gelen NO ve peroksinitrit oluşumu azaltılarak hasarın önlenebileceği ileri sürülmüştür (16). Biz bu çalışmada NO artışının İ/R esnasında kalpte meydana gelen reperfüzyon değişikliğinde iNOS oluşumunun artışı ile ilgili olabileceğini ve dolayısıyla görülen histopatolojik hasarın NO'nun reperfüzyon esnasında oluşan  $O_2^-$  ile birleşmesiyle meydana gelen peroksinitritten kaynaklanabileceğine bağladık. Çalışmamızda zerdeçal uygulanan sıçanlarda NO düzeyi anlamlı olarak düştü. Zerdeçalın insan nötrofillerinde ROT'u ( $O_2^-$  gibi) tam olarak bloke etmesi ve böylece NO'nun serbest kalarak söz konusu bu radikaller tarafından kullanılmasının önlenmesine bağlanabilir.

NO ve hipokloröz asit reaksiyon ürünleri gibi ajanların peroksinitritten bağımsız olarak 3-NT oluşturabildiklerinin bildirilmesine karşın, biyolojik sistemlerde oluşan 3-NT'in yaygın olarak oluşabilen peroksinitritten dolayı olması ve peroksinitrit oluşumunu yansıtması daha olasıdır (85). Hem NO'nun hem de süperoksitin konsantrasyonunun arttığı ve/veya özellikle SOD aktivitesinin düşük olduğu patolojik olaylarda peroksinitrit oluşumu belirgin olarak artar (86). Çalışmamızda kalp İ/R'da 3-NT düzeylerinin artması, kalp İ/R hasarında peroksinitritin oluştuğunu göstermektedir.

PMNL'ler İ/R sonrasında kalp hasarında esas role sahiptirler ve PMN lökositlerin azaltılması bu hasardan koruyucu bir etki oluşturur (16). Çalışmamızda histopatolojik olarak kalp İ/R uygulanan kontrol ve sham grubunda PMNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji ve myositolizis gözlenmiş olması, ortaya çıkan doku hasarında esas olarak; SOR, hücre içi  $Ca^{+2}$  dengesinin bozulması ve inflamatuvar kaskatın aktivasyonu ile oluştuğunu düşündürmektedir. Buna karşın tedavi grubunun histopatolojik incelenmesinde hemoraji dışında hasarın görülmemesi, zerdeçalın kalp İ/R hasarını önlemede önemli ajan olabileceğini işaret etmiştir (16).

Bulgularımız daha önceden farklı antioksidanlarla yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (13, 86). Çalışmamızda zerdeçal; SOD, CAT, MDA, NO, 3-NT, GPER-1, GPx düzeyinde anlamlı farklılıkların saptanmasına yol açtı. Ayrıca histopatolojik olarak da nekroz bulgularının azaldığı gözlemlendi.

Uyguladığımız deney prosedüründe zerdeçalın MDA, NO ve 3-NT düzeylerini ve kalp doku hasarını azaltması, antioksidan enzim düzeylerini (CAT, SOD ve GPx) artırması bu modelde zerdeçalın yararlı etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular; kalp İ/R hasarında oksidatif/nitrozatif stresin önemli rol oynadığı ve buna karşı zerdeçal uygulamasının bu hasara karşı yararlı olabileceğini düşündürmektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızda kalp İ/R oluşturulan ratlarda meydana gelen kalp doku hasarında zerdeçalın GPER-1 ve oksidatif/nitrozatif stres üzerine etkisini araştırdık. Çalışmamızda 250-300 g arasında değişiklik gösteren Wistar Albino tipi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanı olarak sıçanların seçilmesinin sebebi; KSÜ Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarında yetiştiriliyor olması ve İ/R modellerinde kullanılıyor olmasından kaynaklanmaktadır. Bu amaçla, biyokimyasal parametre olarak CAT, SOD, MDA, NO, 3-NT ve GPx (doku) düzeylerini ölçüp, kalp doku kesitlerinden histopatolojik değerlendirmelerini yaptık.

Sonuç olarak;

1) Sham ve kontrol grubu arasında tüm parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p<0,05$ ).

2) Sham ve zerdeçal grubu arasında GPER-1, NO, 3-NT ve GPx hariç diğer parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p<0,05$ ).

3) Sham ve zerdeçal grubu arasında GPER-1, NO, 3-NT ve GPx parametreleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar yoktu ( $p=0,518$ ,  $p=0,244$ ,  $p=0,622$ ,  $p=0,734$ ) ( $p>0,05$ ).

4) Kontrol ve zerdeçal grubu arasında tüm parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p<0,05$ ).

Uyguladığımız deney prosedüründe zerdeçalın kalp doku hasarını azaltması, antioksidan enzim düzeylerini artırması bu modelde zerdeçalın yararlı etkilerinin olabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmamızda histopatolojik olarak İ/R grubunda artan nekrozun zerdeçal uygulaması ile azaldığı görüldü. Bu bulgularımız biyokimyasal sonuçları desteklemektedir.

Sonuç olarak, kalp dokusunun kurtarılması için gerekli olan reperfüzyon, içerisinde miyokardiyal apoptoz ve nekrozun da olduğu bir seri olayın başlamasına sebep olur. Zerdeçal, antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinden dolayı kalbi apoptoza karşı koruyabilir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular; kalp İ/R hasarında GPER-1 ve oksidatif/nitrozatif stresin önemli rol oynadığı ve buna karşı zerdeçal uygulamasının bu hasara karşı yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- 1) Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis MK, Prigouris P, Bakos D, Goutas N, ve ark. Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock: the role of hypoxemic resuscitation. Plos one 2012; 7:3.
- 2) Özel Y. Ratlarda Karaciğer İskemi/Reperfüzyon Hasarında Grape Seed Proanthocyanidinin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, T.C.Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 5.Genel Cerrahi Kliniği 2006; s. 23.
- 3) Kandilci HB, Gümüsel B. Akciğerlerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve İskemik Önkoşullama Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi 2005; s. 25, 35- 49.
- 4) Avatgil R. Deneysel rat iskemi-reperfüzyon böbrek hasarında nitrik oksid'in rolü, Uzmanlık tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı 1997; s. 83.
- 5) Basım S. Alt Ekstremitede İskemi-Reperfüzyon Oluşturulan Ratlarda Ginkgo Biloba EGB 761'in Barsak Anastomoz İyileşmesi Üzerine Etkisi. T.C. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2005; s. 50.
- 6) Karabiga M, Kiriş İ, Yılmaz N, Altuntaş İ, Karahan N, Okutan H. Aprotinin Deneysel Aortik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Böbrek Hasarına Etkisi 2007; s. 16, 9-18.
- 7) Paller MS. The Cell Biology of Reperfusion Injury in the Kidney, J Invest Med 1994; s. 42, 632–639.
- 8) Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, ve ark. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. Asian Pac J Cancer Prev 2014; 15:4405-9.
- 9) Dokuyucu R, Karateke A, Gokce H, Kurt RK, Ozcan O, Ozturk S, ve ark. Antioxidant effects of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia-reperfusion injury. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2014; 183:23-7.
- 10) Granger DN, Rutili G, McCord JM. Role of superoxide radicals in intestinal ischemia. Gastroenterology 1981; 81:22-29.
- 11) Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı Konya, Mimoza Yayınları, 1995; 3-95.
- 12) Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. J Biochem 1984; 222:1-15.
- 13) Ren WY, Qiao ZH, Wang HW, Zhu L, Zhang L. "Flavonoids promising anticancer agents", Medicinal Research Reviews, 2003; 23:519–534.

- 14) Taner SŞ. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Alıç (*Crataegus*) ve Goji Berry (*Lycium barbarum*)'nin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 2016.
- 15) Hazini A. Akut Miyokard İnfarktüsünde İskemi Modifiye Albümin, Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzim Düzeylerinin Araştırılması. İstanbul Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2013, s 1-2.
- 16) Demirhan İ. Deneysel Kalp İskemi-Reperfüzyon Modelinde B<sub>17</sub> Vitamininin Sfingozin-1 ve Oksidatif/Nitrozatif Stres Üzerine Etkisi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Kahramanmaraş, 2017.
- 17) Gül Z. İzole Perfüze Rat Kalbinde Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine 3-Aminobenzamid ve Siklosporin A Kombinasyonunun Muhtemel Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Diyarbakır Dicle Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır, 2012; S.3-4.
- 18) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Temel Patoloji. Çevikbaş U (Çeviren) 5. Baskı. İstanbul, Nobel ve Yüce Kitabevi, 1995; 3-24.
- 19) İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. Part 1 Biochemical mechanism Norol Bil D 2000; 17:2.
- 20) Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in rat. J Clin Invest 1984; 74:1156-1164.
- 21) Laurent B, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. Am J Physiol 1986; 251:F765-F776.
- 22) Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. Am J Med 2000; 109:655-678.
- 23) Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. J Invest Med 1994; 42:632-639.
- 24) Cotran R, Kumar V, Robbins S. Hücre Zedelenmesi Adaptasyon, Basic Pathology. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 1994; 3-11.
- 25) Schrier RW, Arnold PE, Putten VJV, Burke TJ. Cellular calcium in ischemic acute renal failure: Role of calcium entry blockers. Kidney Int 1987; 32:313-321.
- 26) García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. Vascul Pharmacol, 2008; 48:109-114.
- 27) Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg 1996; 83:162-170.

- 28) Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22:46-55.
- 29) Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J Surg Res* 1996; 61:469-472.
- 30) Horgan MJ, Ge M, Gu J, ve ark. Role of ICAM-1 in neutrophil mediated vascular injury after occlusion and reperfusion. *Am J Physiol.* 1991; 259:L315-L319.
- 31) Lefter DJ, Scalia R, Campbell B ve ark. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest* 1997; 4:684-691.
- 32) Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *T4 Thromb Haemost* 2007; 97:738-747.
- 33) Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004; 70:71-86.
- 34) Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61:481-497.
- 35) İkişler M, Erkasap, N. Dernek, S. Kural, T. Kaygısız, Z. Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment, *Anadolu Kardiyol. Derg.* 2007 Dec; 7(4):404-10.
- 36) Şener G1, Yeğen B.Ç2. 'İskemi Reperfüzyon Hasarı' Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı1, İstanbul Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı 2, Klinik Gelişim, İstanbul 2007; 38:5-13.
- 37) Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* 1991; 42:125-138.
- 38) Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22:46-55.
- 39) Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21:1376-1386.
- 40) Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* 1993; 16 (4 Suppl 1):I19-26.

- 41) Öner E. Vitiligo Hastalarında G Protein İlişkili Östrojen Reseptör 1 (GPER-1) Düzeyleri Üzerine Raftlin'in (RFTN-2) Etkisi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş, 2016.
- 42) Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kiabuchi K. Regulation of miyosin phosphatase by Rho and Rhoassociated kinase (Rho-kinase) *Science*, 1996; 273:245-248.
- 43) Sah VP, Seasholtz TM, Sagi SA, Brown JH. The role of Rho in G-protein coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2000; 40:459-489
- 44) Fındıklı E, Camkurt MA, Karaaslan MF, Kurutas EB, Altun H, İzci F, ve ark. Serum levels of G protein-coupled estrogen reseptör 1 (GPER1) in drug-naive patients with generalized anxiety disorder. Volume 244, 30 October 2016, Pages 312-316.
- 45) Kurt AH, Çelik A, Kelleci BM. Oxidative/antioxidative enzyme-mediated antiproliferative and proapoptotic effects of the GPER1 agonist G-1 on lung cancer cells. September 16, 2015; pp. 3177-3182.
- 46) Kabir ME, Singh H, Lu R, Olde B, Leeb-Lundberg LMF, Bopassa JC. G Protein-Coupled Estrogen-Reseptör 1 Mediates Acute Estrogen-Induced Cardioprotection via MEK/ERK/GSK-3 $\beta$  Pathway after Ischemia/Reperfusion. September 10, 2015.
- 47) Kosaka Y, Quillinan N, Bond C, Traystman R, Hurn P, Herson P. GPER1/GPR30 Activation Improves Neuronal Survival Following Global Cerebral Ischemia Induced by Cardiac Arrest in Mice. December 2012; pp. 500-507.
- 48) Edited by John C Foreman, Torben Johansen, Alasdair J Gibb. *Textbook of Reseptor Pharmacology*. Boca Raton, London, New York. ISBN: 978-1-4200-5254-1.
- 49) Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTP'ase superfamily, a coserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 1990; 348:125-132.
- 50) Hall A. The cellular fuctions of small GTP binding proteins. *Science*, 1990; 249:635-640.
- 51) Takai Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, Kawata M. Small GTP- binding proteins. *Int Rev Cytol*, 1992; 133:187-230.
- 52) Madaule P and Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell*, 1985; 41:31-40.
- 53) Christine Barandier, Xiu-Fen Ming, Sandro Rusconi, Zhihong Yang. PKC is required for activation of Rock by RhoA in human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003; 304:714-719.
- 54) Havva Kubat. *Kronik Alkol Alan Farelerde Rho/Rho-Kinaz Yolağının incelenmesi*. Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2007.

- 55) Rainis T, Maor I, Lanir A, Shnizer S, Lavy A. Enhanced oxidative stress and leucocyte activation in neoplastic tissues of the colon. *Dig Dis Sci* 2007; 52 (2):526-30.
- 56) Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem] 2006; 31 (2); 86–95.
- 57) Oksidatif Stres ve Antioksidanlar Oksante Ar-Ge Laboratuvarı 2012.
- 58) Ayşe Eken. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri. *Dermal Medical Publishing* s. 160-169.
- 59) Türk Klinik Biyokimya Derg 2012; 10 (2):57-63
- 60) Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi Cilt: 6, Sayı:23, Yıl:2015
- 61) Bensky D, Gamble A, Gou Qi Zi. *Chinese Herbal Medicine, Materia Medica*. (revised ed). Seattle, Washington. Eastland Press, Inc. pp. 333-334, 1993.
- 62) Cheeseman KH, Slater TF. An Introduction to radical biochemistry. *Br. Med. Bull* 1993; 49:481–493.
- 63) Tian M, Wang M. Studies on extraction, isolation and composition of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi (China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy)*, 2006; 31(19), 1603–1607.
- 64) Atlı Y. İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Alfa Lipoik Asit Ve Quersetin'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı, Uzmanlık Tezi, Kahramanmaraş, 2009; 52:251-259.
- 65) Gao XM, ZM Xu, ZW Li. *Traditional Chinese Medicines*, People's Health Publishing House, Beijing, 2000; pp. 1832–1850.
- 66) Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; 255:H1269-H1275.
- 67) Özer MK, Çiçek E, Gökalp O, Koyu A, Parlakpınar H, Acet A. Myokardiyal İskemi Reperfüzyon Sonrası Böbrek Hasarında Nitrik Oksitin Rolü ve Caffeic Acid Phenethyl Ester (cape)'in Etkisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak. Derg 2005, 12; 23-27.
- 68) Uysal M. “Serbest radikaller, lipit peroksitleri organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar”. *Klinik Gelişim* 1998; 11:336–341.
- 69) Özlem Emir Çoban<sup>1</sup>, Bahri Patır<sup>2</sup>. Antioksidan Etkili Bazı Bitki ve Baharatların Gıdalarda Kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. Cilt:5, No:2, s. 7-19, 2010.
- 70) Yonar SM, Yonar ME, Yöntürk Y. Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)'nda Curcuminin Bazı Antioksidan Parametreler Üzerine Etkisi. *Elazığ Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi*, 23119, 2014.

- 71) Durak ZE. Adenozin Deaminaz Enziminin Kinetik Davranışı Üzerine Zerdeçal (*Curcuma longa*) Ekstresinin Etkilerinin Araştırılması. Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, Cilt:28, Sayı:4, 2013.
- 72) Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem 1990; 36:1440-3.
- 73) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193:265-75.
- 74) Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95:351-358.
- 75) Fridovich I. Superoxide dismutase. Adv Enzymol 1974; 41:35-97.
- 76) Beutler E. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. 2nd ed. New York, Grune and Stratton Inc, 1984; pp. 68-70.
- 77) Uzer N. Sıçanlarda Deri Fleplerinin Yaşayabilirliğinde Curcumin Kullanımının Etkilerinin Araştırılması Uzmanlık Tezi (Deneysel Çalışma) , İstanbul-2007
- 78) Ozan E, Koyutürk L, Sapmaz T. Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Prostoglandin E1 (PGE) Kullanımının İncelenmesi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı. Fırat Tıp Dergisi 2004, 9(3):67-71.
- 79) Prussin C. Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. J Allergy Clin Immunol 2003; 111(2 Suppl):S486-94. (İngilizce Vikipedi Mast hücresi makalesi kaynakçasından)
- 80) Amagase H, Paul CH, Hsu. Meta-analysis of the general effects of a standardized Lycium barbarum fruit juice shown in randomized, double-blind, placebo-controlled human clinical studies. FASEB Journal, 2009; 23, 716.1.
- 81) Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury: Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. Circ Res 1984; 54:277.
- 82) Gülmen Ş, <sup>1</sup>Doğuş DK, <sup>2</sup>Ceylan BG, <sup>3</sup>Çetin NK, <sup>4</sup>Meteoğlu İ, <sup>4</sup>Okutan H, <sup>1</sup>Öcal A<sup>5</sup>. Deneysel Aortik İskemi-Reperfüzyonda Beta-Glukanın Böbrek Hasarı Üzerine Etkisi. Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi, Nisan 2011, Cilt:19, Sayı:2, s. 234-241.
- 83) Annapurna A, Mudagal MP, Ansari A, Rao A S. Cardioprotective activity of chalcones in ischemia/reperfusion-induced myocardial infarction in albino rats. Exp Clin Cardiol. 2012; 17(3):110-4.

- 84) Bozkurt S, Arikan DC, Kurutas EB, ve ark. Selenium has a protective effect on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *J Pediatr Surg* 2012; 47:1735-1741.
- 85) Royall JA, Beckman JS, Kooy NW. Peroxynitrite and other nitric oxide-derived oxidants. In. Zapol WM, Bloch KD, editors, *Nitric Oxide and the Lung*, New York, Marcel Dekker Inc, 1997; pp.223-46.
- 86) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Urinary System, Basic Histology*. Yedinci baskı. Appleton & Lange, Lebanon 1992; pp. 371-393.





## 8. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: İskemik hasarda oluşan reaksiyonlar .....	2
Şekil 2: Kalbin yapısı .....	3
Şekil 3: İskemi/Reperfüzyon hasarının mekanizması .....	6
Şekil 4: $\beta$ ve $\gamma$ alt birimleri sınıfları.....	7
Şekil 5: G Proteini Yapısı.....	10
Şekil 6: G proteini hedefleri .....	12
Şekil 7: Rhodopsin yapısı.....	13
Şekil 8: Serbest radikal oluşumu, antioksidan metabolizma ve lipid peroksidasyonu.....	15
Şekil 9: İskemi sürecinde membran hasarı.....	16
Şekil 10: Serbest radikal oluşumu.....	17
Şekil 11: Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu.....	18
Şekil 12: Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması .....	23
Şekil 13: Lipid peroksidasyonu sonucu MDA oluşumu .....	25
Şekil 14: İskemide glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın rolü .....	32
Şekil 15: Flavonoidlerin antioksidan etki mekanizmaları.....	36
Şekil 16: Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı.....	38
Şekil 17: Gruplar arası SOD düzeyleri.....	63
Şekil 18: Gruplar arası CAT düzeyleri.....	64
Şekil 19: Gruplar arası MDA düzeyleri .....	65
Şekil 20: Gruplar arası GPER-1 düzeyleri .....	66
Şekil 21: Gruplar arası NO düzeyleri .....	67
Şekil 22: Gruplar arası 3-NT düzeyleri .....	68
Şekil 23: Gruplar arası GPx düzeyleri.....	69

## 9. TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Reaktif oksijen partikülleri .....	18
Tablo 2: Fagositlerin oluşturduğu bazı reaktif oksidan ürünler .....	24
Tablo 3: Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı .....	51
Tablo 4: Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı .....	51
Tablo 5: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı .....	52
Tablo 6: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı .....	53
Tablo 7: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı .....	55
Tablo 8: SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı .....	55
Tablo 9: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı .....	56
Tablo 10: Doku örneğinde GPx tayini için deney tüplerinin hazırlanışı .....	57
Tablo 11: Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı .....	59
Tablo 12: Gruplar arası SOD bulguları .....	63
Tablo 13: Gruplar arası CAT bulguları .....	64
Tablo 14: Gruplar arası MDA bulguları .....	64
Tablo 15: Gruplar arası GPER-1 bulguları .....	65
Tablo 16: Gruplar arası NO bulguları .....	66
Tablo 17: Gruplar arası 3-NT bulguları .....	67
Tablo 18: Gruplar arası GPx bulguları .....	68
Tablo 19: Grupların histopatolojik derecelendirilmesi .....	69

## 10. RESİMLER DİZİNİ

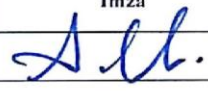
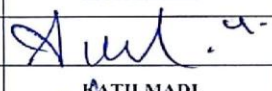

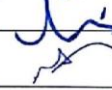


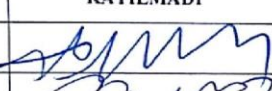
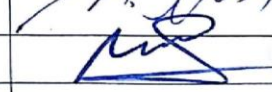


Resim 1: Zerdeçal bitkisi.....	37
Resim 2: Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-1 .....	43
Resim 3: Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-2.....	44
Resim 4: Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-3 .....	44
Resim 5: Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-4.....	45
Resim 6: Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-5 .....	45
Resim 7: Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-6.....	46
Resim 8: Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-7 .....	46
Resim 9: Kalp İskemi/Reperfüzyon çalışması-8.....	47
Resim 10: Miyokard hemoraji.....	60
Resim 11: Miyokard ödem ve kanama.....	61
Resim 12: Miyositolizis ve hipereozinofili .....	61
Resim 13: PMNL infiltrasyonu .....	62

# 11. EKLER

## KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	<b>Araştırmanın Başlığı</b>	Kalp İskemi Reperfüzyon Hasarında Zerdeçal (Curcuma longa)'ın GPER-1 ve Oksidatif/Nitrozatif Stres Biyomarkırları Üzerine Etkisinin Araştırılması	
	<b>Başvuru Tarihi</b>	29.09.2016	
	<b>Protokol No</b>	31	
<b>DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER</b>	<b>Belge Adı</b>	<b>Dili</b>	
	Başvuru Formu	Türkçe	
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>Oturum No: 2016/09</b>	<b>Karar No: 02</b>	<b>Tarih: 04.10.2016</b>
	Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleşmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.		

<b>K.S.Ü. TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU</b>	
<b>BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI</b>	Yrd.Doç.Dr.Akif Hakan KURT

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Araştırma ile ilişki (*)		Katılım (**)		İmza
			E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Akif Hakan KURT Başkan	Tıbbi Farmakoloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ali ÇETİNKAYA Üye	İç Hastalıkları	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN Üye	Tıbbi Biyokimya	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet BOŞNAK Üye	Fizyoloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN Üye	Tıbbi Biyokimya	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İbrahim ORHAN Üye	KBB	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet ACIPAYAM Üye	Kalp Damar Cerrahi	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Bülent ALTUNOLUK Üye	Uroloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Doç. Dr. Atilla YOLDAŞ Üye	Anatomi	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İdris ALTUN Üye	Beyin ve Sinir Cerrahisi	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet DEMİR Üye	Anatomi	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Yrd. Doç. Dr. Adem DOĞANER Üye	Biyostatistik	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Mehmet Emin DARENDELİ Üye	Avukat	Serbest	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Mustafa ÇANSARAN Üye	Mühendis	Tarım İl Müdürlüğü	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
ŞERH (VARSA)							

\*Araştırma ile ilişki  
\*\*Toplantıda Bulunma

## 12. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Seda İKİKARDEŞ  
**Doğum Yeri** : Merkez / Kahramanmaraş  
**Doğum Yılı** : 27.03.1985  
**Uyruğu** : T.C.  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-mail** : seda-2703@hotmail.com

### ÖĞRENİM BİLGİLERİ

**Lise** : Kadriye Çalık Anadolu Lisesi / K.Maraş-Merkez  
**Lisans** : Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Konya)  
(2004-2009)  
**Pedagojik Formasyon** : Fırat Üniversitesi Eğitim Fakültesi (Elazığ) ( 2010-2011)  
**Yüksek Lisans** : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (2015-2017).

### YAYINLAR

1) Mehmet Sertkaya, Mehmet Fatih Yazar, Ömer Faruk Boran, Aykut Urfalioglu, Yasir Bahar, Hasan Dagli, Seda İkikardes, Metin Kilic. Research into the protective effect of syringic acid in rats with induced experimental pancreatitis.

Kahramanmaras Sutcu Imam University, Kahramanmaras, Turkey. Balkan States Anesthesia Days-IV, ARUD. 17-20 May 2017.

2) Fatma Betül Güzel, Ahmet Fazıl Görgel, Hasan Dağlı, Seda İkikardeş, Mehmet Akif Sarıca, Ahmet Çelik, Ertuğrul Erken, Orçun Altunören, Özkan Güngör. Böbrek Nakli Hastalarında Ultrasonografik Elastografi Skorları ve Prolidaz Aktivite İlişkisi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, 19. Ulusal Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Kongresi K.K.T.C. PS-015. 10-14 May 2017.