



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL KALP İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE  
LİKOPEN'İN KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ÖZLEM BOZKUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2018

**T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL KALP İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE  
LİKOPEN'İN KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**ÖZLEM BOZKUŞ**

**Bu tez,  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS  
derecesi için hazırlanmıştır.**

**KAHRAMANMARAŞ 2018**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Özlem BOZKUŞ tarafından hazırlanan “Deneysel Kalp İskemi-Reperfüzyon Modelinde Likopen’in Koruyucu Rolünün Araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 12/01/2018 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ergül Belge KURUTAŞ (DANIŞMAN) .....

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D.

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd.Doç.Muhammed SEYİTHANOĞLU (ÜYE)

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D.

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. M.Akif ÇÜRÜK (ÜYE)

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.B.D.

Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

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, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Özlem BOZKUŞ



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.  
Proje No:2016/6-37 YÜKSEK LİANS

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 bilgi ve 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 ve Öğretim üyeleri hocalarım Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN ' a , Yrd. Doç. Dr. Muhammed SEYİTHANOĞLU'a, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN'e, Yrd. Doç. Dr. Filiz ALKAN BAYLAN'a,

Tez çalışmama histopatolojik incelemeleriyle önemli katkılarda bulunan Prof. Dr. Sevgi BAKARIŞ hocama,

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencisi Safiye Şeyma TANER'e ve arkadaşım Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans öğrencisi Erkan ÖNER'e,

Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma laboratuvarı personelimiz Abdullah YILMAZ'a, Her zaman maddi manevi yanımda olan ve her türlü desteğini üzerimden hiç bir zaman eksik etmeyen Ailem ve Eşim Umut BOZKUŞ'a en içten teşekkürü bir borç bilirim.

Özlem BOZKUŞ

# DENEYSEL KALP İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE LİKOPEN'İN KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ÖZLEM BOZKUŞ

## ÖZET

İskemi, doku hasarı ile sonuçlanan, dokuya yetersiz oksijen ve besin desteğine yol açan kan akımı durması veya azalmasını ifade eder. Kalp dokusunun yaşamının devam edebilmesi için iskemik alanın erken reperfüzyonu önemlidir. Ancak reperfüzyonun kendisi de, reperfüzyon hasarı olarak adlandırılan kalp hücrelerinin ölümü ile sonuçlanır. Kalp iskemisi sonrası reperfüzyonun yol açtığı ağır oksidatif stres ciddi işlevsel ve yapısal hasara yol açmaktadır. Bu hasardan başlıca serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır. Kalp cerrahisinde uygulanmakta olan anestezi teknikleri kalbi koruma yöntemleri ve cerrahi tekniklerdeki gelişmelere rağmen, kalp iskemisi reperfüzyon hasarı mortalite ve morbiditenin halen en önemli nedenlerinden biridir.

İskemi sonrası reperfüzyonun yol açtığı ağır oksidatif stres ciddi işlevsel ve yapısal hasara yol açmaktadır. Bu hasardan başlıca serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır. Son yıllarda farklı organlarda yapılan çalışmalarda reperfüzyon kaynaklı hasara karşı iskemik önkoşullama gibi yöntemlerin yanı sıra birçok antioksidan maddenin koruyucu etkileri gösterilmiştir.

Likopen, sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan karoten ailesine ait bir pigmenttir. Domatese ek olarak ürünleri de likopen açısından zengindir. Likopen aynı zamanda antioksidan bir maddedir. Likopen, hücreleri serbest radikal hasarından korunmasının yanı sıra, hücreler arasındaki bağları güçlendirmekte ve hücre metabolizmasını geliştirmektedir. Yağda çözünen, yağ miktarı fazla doku ve organlarda etkinliği artan likopen, yağ içeriği oldukça fazla olan ciltte de antioksidan koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Diğer bir yararlı etkisi, ultraviyole ışınlarla karşı koruma sağlamasıdır. Likopen aynı zamanda kolesterol düşürücü özelliğe sahiptir. Göğüs, rahim, karaciğer, prostat kanserlerinden koruyan, Alzheimer hastalığını önleyen, kalp damar hastalıkları, kemik ve cilt sağlığı açısından koruyucu etkisi bulunan likopen antioksidan özelliğiyle yaşlanma sürecini de yavaşlatmaktadır.

İlk defa yapılan bu çalışmamızda, Likopenin kalp iskemi-reperfüzyon hasarına olan biyokimyasal ve histopatolojik etkileri 24 ergin erkek rat üzerinde araştırıldı. Ratlar randomize olarak üç gruba ayrıldı; kontrol (n=8), sham (n=8) ve Likopen tedavi grubu (n=8). Sham ve Likopen gruplarındaki ratlara deneyden, iki gün öncesinden başlanarak günde bir kez 1 mL serum fizyolojik (% 0,9 NaCl/kg/gün ve 50 mg /kg/gün Likopen intraperitoneal yolla verilirken kontrol grubundakilere hiç bir şey uygulanmadı. Daha sonra tüm gruptaki ratlara girişim ve cerrahi işlemden sonra kalpte 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyona oluşturuldu. Reperfüzyonun takibinde sham ve Likopen gruplarındaki ratlara tekrar 1mL (tek doz) serum fizyolojik ve Likopen (tek doz) intraperitoneal yolla verilirken kontrol grubundakilere hiç bir şey uygulanmadı. Deneyin sonunda tüm ratlar sakrifiye edildi ve kalp dokusunda oksidatif/nitrozatif stresin biyobelirteçleri olarak katalaz (CAT), superoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve nitrotirozin (3-NT) düzeyleri ölçüldü.

Biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler sonunda sham, kontrol ve tedavi grupları birbirleriyle kıyaslandığında anlamlı farklılık bulundu. ( $p<0,05$ ). Kontrol ve sham gruplarında Likopen tedavi grubuna göre MDA, NO ve 3-NT düzeyleri yüksek iken, CAT ve SOD aktiviteleri oldukça düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Kontrol ve sham grupları arasında MDA, NO, 3-NT, CAT ve SOD düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandı ( $p<0,05$ ). Histopatolojik olarak kontrol ve sham grubunda PNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji ve miyositolizis gözlenirken Likopen tedavi grubunda sadece hemoraji gözlemlendi.

Bulduğumuz veriler neticesinde, Likopen tedavi grubunda antioksidan aktivitenin yüksek, oksidatif/nitrozatif stres düzeylerinin düşük olduğu saptandı. Buna ek olarak Polimorf Nüveli Lökositlerinin filtrasyon derecesinin de daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum, Likopenin kalp iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine antioksidan olma özelliğine bağlı olarak koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kalp iskemi-reperfüzyon hasarı, Likopen, Oksidatif/Nitrozatif stres.

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kasım/ 2017

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

**Sayfa sayısı:** 79

# **PROTECTIVE ROLE INVESTIGATION OF LYCOPENE IN EXPERIMENTAL HEART ISCHEMIA REPERFUSION MODEL**

**(MASTER THESIS)**

**MSC. OZLEM BOZKUS**

## **ABSTRACT**

Oxidative stress due to reperfusion after ischemia causes severe functional and structural damage. Free oxygen radicals are responsible for this damage. Besides techniques such as ischemic preconditioning the protective effects of many antioxidant substances has been shown in many of the lately carried out studies.

Ischemia refers to the reduction or cessation of blood flow which results in tissue damage and causes insufficient oxygen and nutrition to the tissues. For the continuity of heart tissue, the early reperfusion of the ischemic area is essential. However; the reperfusion itself, too results in the death of the heart cells which is called reperfusion injury. After the cardiac ischemia, the oxidative stress caused by the reperfusion leads to serious functional and structural damage. Free oxygen radicals are held responsible for this damage. Despite the anesthesia techniques being applied in cardiac surgery, heart protection methods and improvements in surgical techniques, cardiac ischemia-reperfusion injury is one of the most important reasons of mortality and morbidity.

In this study, for the first time, Lycopene 's biochemical and histopathological effects on cardiac ischemia-reperfusion injury were investigated on 24 adult male rats. Rats were randomly divided into 3 groups: Control (n=8), Sham (n=8) and Lycopene therapy group (n=8). While 2 days before the experiment, 1 mL normal saline (%0,9 NaCl /kg/day and 50 mg /kg/day) was started to apply to the rats in sham and lycopene groups intraperitoneally once a day, nothing was implemented on the control group. Then; after the venture and surgical procedure applied to the all rats groups, 10 minutes ischemia and 10 minutes reperfusion of the heart was created. In pursuit of the reperfusion, again 1 mL normal saline (single dose) and Lycopene (single dose) were applied to the rats of sham and lycopene groups while nothing was implemented on the control group. At the end of the experiment, all rats were sacrificed and as the markers of oxidative/ nitrosative stress on heart tissues, the levels of catalese (CAT), superoxide dismutase (SOD), malandialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and the nitrotirozin (3-NTx) were measured.



At the end of biochemical and histopathologic examinations, sham, control and treatment groups were significantly different when compared to each other ( $p<0,05$ ). The MDA, NO, and 3-NT levels were higher in the control and sham group than in the lycopene treatment group, but CAT and SOD activities were significantly lower. ( $p<0,05$ ). There were statistically significant differences between control and sham groups in terms of MDA, NO, 3-NT, CAT and SOD levels. ( $p<0,05$ ). Histopathologically, PNL infiltration, edema, hemorrhage, and myocytolysis were observed in the control and sham group, but only hemorrhage was observed in the lycopene treatment group.

As a result of the data we found, high levels of antioxidant activity and low oxidative / nitrosative stress levels were found in the lycopene treatment group. In addition, the infiltration rate of polymorphic core leucocytes was also lower. This suggests that lycopene may be protective against cardiac ischemia-reperfusion injury due to its antioxidant properties.

**Key words:** Cardiac ischemia-reperfusion injury, Lycopene, Oxidative / Nitrosatif stress.

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam

Institute Of Medical Sciences

Department of Medical Biochemistry Nov/ 2017

**Supervisor:** Prof. Dr.Ergül Belge KURUTAS

**Page Numbers:** 79

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER: .....	3
2.1. İSKEMİ/ REPERFÜZYON: .....	3
2.1.1. Kalp İskemi Reperfüzyon Nekroz Hasarı .....	3
2.1.2. Kalp İskemi Reperfüzyon Sırasında Serbest Radikal Oluşumu .....	4
2.1.3. Kalp İskemi Reperfüzyon Sırasında Süperoksit Kaynakları .....	5
2.1.4. Serbest Radikal Aracılı Hasar .....	5
2.2. Kalpte İskemi-Reperfüzyon Hasarı .....	6
2.2.1. Reperfüzyon Hasarının Mekanizmaları .....	8
2.2.2. Ca <sup>+2</sup> sitotoksitesi .....	8
2.2.3. Oksijen Paradoksu ve Reperfüzyon Hasarı .....	9
2.2.4. Reperfüzyon Hasarında Nötrofil Aktivasyonunun Rolü .....	10
2.3. İskemi- Reperfüzyon Hasarının Kalp Üzerindeki Etkileri .....	10
2.4. Serbest Radikaller .....	11
2.4.1. Serbest Radikallerin Etkileri .....	12
2.4.1.1. Karbonhidratlara Etkileri .....	12
2.4.1.2. Lipidlere Etkileri .....	13
2.4.1.3. Proteinlere Etkileri .....	13
2.5. Nitrik oksit .....	13
2.6. Oksidatif Stres .....	14
2.6.1. Antioksidanlar .....	14
2.6.1.1. Endojen antioksidanlar .....	15
2.6.1.2. Eksojen antioksidanlar .....	15
2.6.1.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD) .....	15
2.6.1.2.2. Katalaz .....	16
2.6.1.2.3. Glutasyon Peroksidaz (Gpx) Ve Glutasyon Redüktaz (GR) .....	16
2.6.1.2.4. Glutasyon S-Transferaz (GST) .....	17
2.6.1.2.5. Glutasyon (GSH) .....	17
2.6.1.2.6. Vitamin E (α-tokoferol) .....	17
2.6.1.2.7. Vitamin C (Askorbik Asit) .....	17
2.6.1.2.8. Karotenoidler .....	18
2.6.1.2.9. Ürik Asit .....	18
2.6.1.2.10. Melatonin .....	18

2.7. Nitrozatif stres .....	18
2.7.1. Kardiyovasküler Hasarı.....	19
2.7.2. DNA Hasarı .....	20
2.7.3. Nitrozatif Stres Biyomarkırları.....	21
2.7.3.1. Nitrik Oksit .....	21
2.7.3.2. Nitrotirozin (3-NT).....	22
2.8. Likopen .....	25
2.8.1. Likopenin Etkileri .....	28
3. MATERYAL VE METOT.....	31
3.1. Deney Grupları .....	31
3.2. Cerrahi Yöntem .....	32
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	33
3.4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	34
3.5. Homojenat Hazırlama .....	35
3.6. Protein Düzeyinin Tayini.....	35
3.7. NO (nitrit+nitrat) ölçüm yöntemi: .....	37
3.8. Nitrotirozin (3-NT) Düzeyi .....	38
3.9. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini .....	38
3.10. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini .....	41
3.11. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini.....	44
3.12. Histopatolojik Değerlendirme .....	45
3.13. İstatistiksel analiz .....	46
4. BULGULAR.....	47
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇ .....	59
7. KAYNAKLAR .....	61
8. ŞEKİLLER DİZİNİ.....	74
9. TABLOLAR DİZİNİ .....	75
10. GRAFİK DİZİNİ.....	76
11. RESİMLER DİZİNİ.....	77
12. EKLER .....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	79

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>ADP</b>	: Adenozin Difosfat
<b>PMNL</b>	: Polimorfonükleer Lökositler
<b>NADPH</b>	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>İ/R</b>	: İskemi reperfüzyon
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit Anyon Radikali
<b>HOCl</b>	: Hipoklorik Asit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>ROR</b>	: Reaktif Oksijen Radikalleri
<b>KSÜ</b>	: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>FAD</b>	: Flavin Adenin Dinükleotit
<b>OH·</b>	: Hidroksil Radikali
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub>·</b>	: Singlet Oksijen
<b>H·</b>	: Hidrojen Radikali
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>GSH</b>	: Redükte Glutasyon
<b>ROO</b>	: Peroksil Radikali
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>GSSG</b>	: Okside Glutasyon
<b>OD</b>	: Optik Dansite
<b>SOR</b>	: Serbest Oksijen Radikalleri
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NT</b>	: Nitrotrozin

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

20. yüzyılda eğitim ve gelir düzeyinde artma, beslenme biçimlerinin değişmesi, bulaşıcı hastalıkların kontrolü gibi etkenler beklenmiş olan yaşam süresinin artmasına sebep olmuştur. Yaşam süresinin artması istenilen bir olgu olmakla birlikte paralelinde hastalıkların rastlanma sıklığının da yükselmesine sebep olmuştur. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülke ekonomilerinde vakalar ekonomik riskler oluşturmakta, sağlık hizmetlerinin sunum sistemlerinin devamlılığını tehdit etmektedir. Düşük ve orta gelir düzeyindeki ülkelerde ise daha ağır bir yük oluşturmakta, sağlık hizmeti bakım ve tedavi masrafları kişileri hızla alt gelirlilik sınırının altına düşürebilmektedir (1).

Koroner kalp hastalığı, dünya üzerinde bulunan çoğu ülkede ölümlerin en büyük sebebi olmakla beraber Dünya Sağlık Örgütü bulgularına bakıldığında her yıl ortalama 3.8 milyon erkeğin ve 3.4 milyon kadının bu hastalıktan öldüğünü belirtmiştir (2).

İskemi, bir dokuyu besleyen damarların; pıhtı, emboli veya diğer bir fiziksel etkene bağlı olarak tıkanması sonucu, bu dokunun kanlanmasının ve oksijenlenmesinin bozulması ile gelişen hastalık olarak tanımlanır. Reperfüzyon ise, yine aynı sebeplerle tıkanmış olan damarlardaki tıkanıklığın ortadan kaldırılması ile açılması ve dokunun tekrar kanlanmaya başlaması reperfüzyon olarak ifade edilir. İskeminin derecesi ve zamanına bağlı olarak hücre hasarından doku nekrozuna kadar değişebilen bir dizi hasar oluşabilir. Aynı zamanda, reperfüzyonun oluşturacağı yoğun oksidatif stres sonucunda iskemide görüldenden çok daha ağır işlevsel ve yapısal hasarlar meydana çıkabilir. Reperfüzyonda izlenen oksidatif stres kaynaklı hasarda serbest radikaller başlıca rol oynamaktadır. Yapılan birçok araştırmada serbest radikallerin sebep olduğu hücre hasarının azaltılmasında iskemik önkoşullama, farmakolojik önkoşullama gibi hücreyi daha ciddi iskemik ataklara karşı hazırlayıcı deneysel yöntemlerin yanı sıra vücuttaki koruyucu etkili endojen antioksidan sistemler ve tedavide ekzojen antioksidanlar da yaygın olarak kullanılmıştır.

Ortaya çıkan iskemi reperfüzyon hasarına karşı kullanılan pek çok antioksidan ajan arasında likopen de yer almaktadır. Likopen'in, reperfüzyon döneminde izlenen yoğun oksidatif strese karşı pleiotropik etkileri arasında sayılan antioksidan ve antienflamatuar etkinliğiyle koruyucu etkinliğinin bulunduğu gösterilmiştir.

Birçok çalışmada, karaciğer, böbrek ve bağırsak gibi organlarda oluşturulan deneysel iskemi reperfüzyon hasarında likopenin koruyucu etkisi biyokimyasal, histolojik incelemeler ve nekroz alanı tayini ile gösterilmiştir.

Çalışmamızda ise rat kalbinde iskemik ön koşullama tekniği kullanarak iskemi reperfüzyon modeli oluşturup; Deneysel Kalp İskemi-Reperfüzyon Modelinde Likopen'in Koruyucu Rolünün Araştırılmasını hedefledik.



## **2.GENEL BİLGİLER:**

### **2.1. İSKEMİ/ REPERFÜZYON:**

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijen (O<sup>2</sup>)'den maruz kalması sonrası oluşan hasar ile tanımlanan iskemi, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne neden olmaktadır. İskemik dokuya hücrenin rejenerasyonu ve toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ağır bir hasara sebep olur. Reperfüzyon döneminde oluşan hasarda, hücre içine moleküler O<sup>2</sup> girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar; zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit (DNA) molekülleridir (3)

#### **2.1.1. Kalp İskemi Reperfüzyon Nekroz Hasarı**

Kalp cerrahisi sonrası miyokard nekrozu, global miyokard iskemisinin başlaması, sürmesi ve reperfüzyonla şiddetlenmesi ile gelişen kompleks bir sürecin son aşamasıdır. İskemi süresi "aşırı" olmadıkça ki aşırı ne kadar bilinmiyor, nekrozun önlenmesi için reperfüzyon uygun şekilde modifiye edilebilir(4). İskemi başladıktan hemen sonra kontraktıl güç, miyokard pH'sı, mitokondrideki oksidatif fosforilasyonla ATP üretimi, oksidatif metabolizma ve elektron transportu hızla azalır(5,6). Bu aşamada anaerobik glikolizle bir miktar daha ATP üretilmeye devam edilir. Miyokard hücreleri tarafından yağ asiti alımı devam ettiğinden yağ asiti kullanımı da hızla azalır. Laktat ve protonların sitoplazmaya birikmesi ile intraselüler asidoz gelişir. Bu durum anaerobik glikolizi suprese eder. Bütün bu olaylar hücre membranının hasarına katkıda bulunur ve hücre şişer, kalsiyum artar, iyon transportu bozulur, miyokardın enerji ve glikojen depoları akut olarak azalır (7). Adenozin, inozin ve diğer nükleotidler hücreden ayrılır. Erken fazdaki ultrastrüktürel değişiklikler glikojen granüllerinin kaybı ve bazı organellerin şişmesiyle sınırlıdır. İskemi süresi uzadıkça hücre içine daha fazla yağ asiti girmeye devam eder, diastolik arrest gelişir. İskemi başlangıcından sonraki 15 dakika içinde sarkolemmal membran geçirgenliğinin kontrolü kaybolur(8). Nonspesifik membran geçirgenliği artar. Sitoplazmik proteinler, enzimler, adenozin, laktat ve diğer küçük moleküller hücre dışına

kaçmaya devam eder. Bunlar kalp interstisyumu ve lenfde açıkça görülür(7). Hücre metabolik dönü- şümle ortaya çıkan aktif moleküller sonucu giderek şişer. Hücresel metabolizma ve ATP üretimi kesilir, glikojen depoları tükenir(9). Glikoliz ve mitokondriyal fonksiyon total olarak kaybolur, hücresel otoliz olur ve hücre içeriği boşalır. ATP tükenmeye devam ettikçe sonunda kritik bir seviyeye ulaşılır ve bu aşamada miyokarda kontraktür görülmeye başlar(10). ATP depolarının boşaldığı ve nekrozun geliştiği bu kritik eşik noktayı kontraktür görünümünün saptanması belirler. Beklendiği üzere kontraktür önce subendokardiyum tabakasından başlar. Hipertrofide kontraktür erken gelişirken, hipotermi uygulaması ile gecikir. Klasik inanişaya göre bir kere kontraktür tamamlanırsa, artık geri dönüş çok zordur. Kontraktür gelişim zamanı yüksek oranda tür bağımlıdır. Rat kalbinde kristaloid ve kan ile perfüze edilen preparatlarda bile büyük farklılıklar görülmüştür(11). Tahminen insan kalbinde bu kritik noktaya erişme süresi daha uzundur.

### **2.1.2. Kalp İskemi Reperfüzyon Sırasında Serbest Radikal Oluşumu**

Moleküler  $O_2$ 'nin miyokardiyuma tekrar sunumunun farklı tipte bir hasarı indükleyebileceği ve hücresel enzimlerin geniş bir fraksiyonunun hipoksi sırasında değil de ani reoksijenasyonda salındığı fikri ilk olarak 1973 yılında Hearse ve ark. tarafından ortaya atılmıştır (12). Bu kavram ekzojen glukozun anoksik perfüzata kısıtlı endojen miyokardiyal rezervi desteklemek için ortama dahil edilmesinin, reperfüzyonda hücre hasarına neden olduğunun bulunması ile desteklendi (13). Böylece post İ/R'den sonra miyosit hasarı, paradoksal olarak enerji yoksunu hücrelere  $O_2$ 'nin yeniden sağlanmasına bağlandı. 1980'de, Guarnieri ve ark. (14) İ/R'nin süperoksit dismutaz aktivitesini bozduğu ve lipid peroksidasyonunu artırırken hücresel glutatyon: glutatyon disülfid oranını azalttığını meydana çıkardı, bu da reperfüzyonda üretilen süperoksit anyon radikallerinin ( $O_2^-$ ) endojen hücresel antioksidan sistemlerinin kapasitesini aştığına işaret eder. Tüm bunların ve diğer benzer çalışmaların sonuçları, iskemi sırasında metabolizmayı düşüren ekivalanların biriktiği ve bunun reperfüzyonda  $O_2$  merkezli serbest radikal oluşmasında görev aldığı fikrini ortaya atmıştır. Süperoksit dismutaz varlığında ve yokluğunda izole kalp modellerini kullanarak yapılan deneylerle  $O_2$  türevi radikaller reperfüzyon hasarının olası mediyatörleri olarak belirlenmiştir (15). Elektron spin rezonans spektroskopisini ilk kez kullanan öncü çalışmalar, İ/R sırasında izole tavşan kalbi modelinde  $O_2$ , nitrojen, karbon merkezli serbest radikal oluşumunu tanımladı (16). Buna yakın sonuçlar bağımsız olarak izole rat modellerinde alındı. Reaktif  $O_2$  ve nitrojen türlerinin oluşumunun iskemik



paterni hipoksik reperfüzyon ile değişmemiştir ama bu üç sinyal de  $O^2$  perfüzyonunda pik yapmıştır. Daha sonra 'spin trapping';  $O^{2-}$ , hidroksil radikali (OH) ve bir karbon merkezli radikali reperfüzyonda tanımlamak için kullanılmış ve bunların kümülatif oluşumunun süperoksit dismutaz ile bozulduğu bulunmuştur. Buna bağlı olarak  $O^{2-}$ , hem OH hem de karbon merkezli radikal oluşumu için prekürsör olarak görev yapan ana radikal olarak adlandırdı (17). İzole kalp araştırmaları daha sonra  $O^{2-}$ 'nin benzer biçimde reperfüzyonda hedef radikal olduğunu belirleyen intakt bir köpek modelde serbest radikal oluşumunun açıklanmasıyla doğrulandı (18). 1980'lerin sonlarında  $O^2$  merkezli radikalleri direkt saptayıp açıklayabilen yöntemlerin gelişmesi miyokardiyal İ/R sırasında SOR oluşumunun belirlenmesi için kritikti. Reperfüzyon sırasında gözlenenlere yakın düzeyde ekzojen olarak SOR uygulanan sonraki çalışmalarda, benzer  $Ca^{+2}$  yüklenmesi, fonksiyonel depresyon ve metabolik değişimler ortaya konuldu, bu da SOR'u bu hasarın santral mediyatörleri olarak belirledi (19).

### **2.1.3. Kalp İskemi Reperfüzyon Sırasında Süperoksit Kaynakları**

$O^2$  farklı orbitallerde iki eşlenmemiş elektron barındıran iki atomdan oluşur.  $O^2$ 'nin yüksek elektron ilgisi vardır ve kendisi kısmen reaktif haldedir.  $O^2$  dört elektron ve proton olarak su moleküllerini meydana getirmek için tamamen indirgenir. Alternatif olarak, kısmen indirgenmiş  $O^2$  stabil olmayan ara ürünler verir.  $O^{2-}$ 'ye tek bir elektron eklenmesi  $O^{2-}$ , sulu bir ortamda diğer bir elektron eklenmesi ile hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) meydana gelir, bu da sonra yüksek reaktif OH'a indirgenir. Bütün bu indirgenmiş  $O^2$  formlarının her biri İ/R esnasında meydana gelir ama süperoksit dismutaz kullanan deneyler açık bir şekilde  $O^{2-}$ 'nin ana radikal olduğuna işaret eder (18).  $O^{2-}$ 'nin düşük seviyeleri çoğunlukla normal fonksiyon gösteren hücrelerin mitokondriyal transport zincirlerinde üretilir. Buna karşın İ/R'de  $O^{2-}$  oluşumu sitokrom p450 aktivitesi, mitokondriyal elektron transport hasarı ve ayrışma, hücresel ksantin dehidrogenazın ksantin oksidaza dönüşmesi, NAD(P)H oksidaz aktivitesi ve ayrışmış nitrik oksit (NO) sentaz aktiviteside dahil multipl potansiyel hücresel kaynaklar ile çok daha geniş bir ölçekte oluşur (19).

### **2.1.4. Serbest Radikal Aracılı Hasar**

Miyokard fonksiyonları sistol-diyastol döngüsü içinde senkronize bir elektriksel devre biçimindedir ve kontraksiyon kardiyomiyositler boyunca kordineli bir iletkenliğe bağlıdır. İ/R'nin ardından bozulmuş kalp fonksiyonu, miyokardiyal iletim ağını bölgesel olarak bozan hücre hasarının bir göstergesidir. Oluşan bu hücre hasarının şiddeti

reverzibldan irreverzibla kadar değişkenlik gösterebilir ve kardiyomiyositlerde SOR reaksiyonlarının büyüklüğü ile orantılıdır (20). Biyolojik hasar kapsamında serbest radikal propagasyon reaksiyonları primer olarak alken grubundan hidrojen ayrılmasıyla neticelenir. Radikal reaksiyonlarının birinci fazı orijinal radikali meydana getiren bir başlangıçtır. İ/R hasarı kapsamında, başlangıç reaksiyonları ile O<sup>2-</sup>, NO, CO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve OH oluşur. İkinci faz bir propagasyon reaksiyonları serisidir. Bunlar çoğunlukla alkil radikali üretmek için alken grubundan H<sup>+</sup> atomu ayrılmasını ve peroksil radikali oluşturmak için alkil radikaliyle moleküler O<sup>2</sup> birleşmesi gibi ek reaksiyonları kapsar.

Radikal reaksiyonlarının ürünleri non enzimatik olarak modifiye olmuş organik moleküllerdir, bunlar oluştukları daha büyük hücresel yapıların fonksiyonlarına genellikle yıkıcı etkiye sahiptir. Bu yüzden, lipid peroksidasyonu ürünleri hücre membran bütünlüğünü veya orada gömülü proteinleri riske atabilir; amino asit nitrasyonu normal protein fonksiyonunu bozabilir. DNA oksidasyonu mutajeniktir. Radikal reaksiyonların yarı rastlantısal doğası her zaman irreverzibl hücre hasarına sebep olmaz. Eğer kritik olmayan proteinler fraksiyonel olarak hasarlanmışsa veya membran, protein veya DNA hasarının ölçüsü fonksiyonu olumsuz etkilemezse hücre hayatta kalır. Bu durumda, fosfolipid ve protein 'turnover'ı gibi normal hücre süreçleri değişmiş biyomolekülü yok edebilir. Alternatif olarak, radikal reaksiyonlar kritik biyomolekülleri pro-apoptotik süreçleri başlatacak şekilde denatüre veya aktive edebilir. Daha şiddetli vakalarda, radikal reaksiyonları kritik hücre fonksiyonlarını ve/veya membran bütünlüğünü tehdit ettiğinde, hücre nekrotik hale dönüşür (19).

## **2.2 Kalpte İskemi-Reperfüzyon Hasarı**

Miyokard iskemisi, miyokardın metabolik gereksinimlerine göre, yetersiz kan akımı ile karakterize bir durumdur. Miyokarda oksijen sunumu ve ihtiyacı arasındaki dengesizlik sonucu oluşan iskemi, dokuda hipoksi ve anaerobik metabolizmaya yol açar (21).

Miyokard iskemisi, aterosklerotik koroner arter hastalığının major sonuçlarından biridir ve koroner arter hastalığıyla ilişkili çeşitli klinik sendromlara yol açar. Anjina pectoris ve miyokard enfarktüsü bunun iki klinik göstergesidir. Miyokard iskemisi aşırı egzersiz, kalp cerrahisi, kardiyak transplantasyonlar, perkütan translüminal koroner anjioplasti gibi çeşitli durumlarda da karşımıza çıkmaktadır (20,22).

İskemi sırasında miyokardın enerji dengesi çabucak bozular. ATP (adenozin trifosfat) düzeyi azalır, ADP (adenozin difosfat) düzeyi artar. Hücreler ATP üretimini

devam ettirebilmek için glikojeni kullanarak glikoliz yapar. Anaerobik şartlarda glikolizin son ürünü olan pirüvat, laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi ile laktata çevrilir. İskeminin uzaması enerji balansını daha da bozar. ADP adenosin ve küçük oranda inosine kadar hidrolize uğrar. Bu işlem sırasında büyük oranda proton üretilir. Hücre pH'nın azalması glikolizi inhibe eder. Ciddi ve uzun süreli iskemi ile ATP depolarının %80 ve daha fazlası kaybolursa, hücrenin hacim ve iyon bütünlüğünü idame ettirme kabiliyeti kaybolur. Koroner kan akımı yeniden başlamazsa geriye dönüşümsüz miyokard hasarı (nekroz) son noktadır (23,24).

Miyokardiyal iskemi için kritik zaman 20 dk olarak kabul edildiğinden bundan daha kısa süreli iskemilerden sonra sağlanan reperfüzyon durumunda doku hasarının kanıtı bir bulgu saptanmamıştır. 20 dakikadan daha uzun süre devam eden iskemi durumlarında oluşan reperfüzyon hasarı, birbirinden bağımsız etiolojiler sonucunda olmaktadır. Reperfüzyonun dakikalar ile saatler arasındaki döneminde nekroz ve apoptosis nedeniyle hücre ölümünün artışı gibi farklı nedenler miyokard hasarının artmasına neden olmaktadır (25,26,27). Uzamış iskemiden sonra kalp kasının reperfüzyonu, reperfüzyon aritmilerine, mikrovasküler hasara, miyokardiyal stunninge ve miyokardiyal hibernasyona neden olduğu saptanmıştır.

Miyokardiyal stunning, iskemi epizodu veya epizodları sonrasında oluşan kontraktıl disfonksiyondaki uzamadır. Bu durum reperfüzyon sonrası irreversibl hasar olmamasına ve perfüzyonun normal veya normale yakın olmasına rağmen devam eden mekanik disfonksiyonu ifade eder. Miyokardiyal hibernasyon, düşük kan akımı ile seyreden uzamış kontraktıl disfonksiyonun bir formudur. Yapılan klinik gözlemler, viabilitenin korunması ve enerji gereksiniminin azaltılması, azalmış perfüzyona uyum sağlamak için miyokardiyumun kontraktılitesini azaltarak kronik iskemiye adapte olduğunu göstermiştir. Klinik olarak koroner arter bypass cerrahisi sonrası bozuk ventrikül fonksiyonun gelişme gösterdiği rapor edilmiştir. İskeminin süresi, ciddiyeti, hibernasyon bölgesindeki miyositlerdeki etkilenme derecesi iyileşme süresini belirler. Fonksiyonun ani iyileşmesi, hibernasyonun akut olduğunu, günlerden haftalara kadar olan iyileşmeler subakut hibernasyonu, aylardan yıllara kadar olanlar ise kronik hibernasyonu düşündürür (28,29). Miyokardiyal stunning, ilk kez Heyndrickx ve ark. Tarafından 1975 yılında köpeklerde kısa koroner oklüzyonla ilgili olarak tanımlanmıştır. Bununla ilgili yapılan çalışmalar kabaca 6 kategoride gruplandırılmıştır.

1. Orijinal olarak Heyndrickx ve ark. Tarafından tanımlanan tek ve tamamıyla reversibl in vivo iskemiye takiben oluşan stunning.

2. İn vivo, tamamıyla reversibl rejyonel multipl iskemi periyodlarını takiben oluşan stunning. (Örn. Köpeklerde tekrarlayıcı 5–10 dk koroner oklüzyonu takiben).
3. Kısmen reversible, kısmen irreversible in vivo rejional iskemi epizodlarını takiben oluşan stunning. Bu kategori trombolizis tedavisi alan veya anjioplasti geçiren akut myokard infarktüsülü hastaların durumunu temsil eder ve kurtarılmış dokuların fonksiyonunu, gecikmiş iyileşmesini gösterir.
4. İn vitro global iskemi sonrası stunning. (Örneğin izole kalp preparatları)
5. İn vivo global iskemiyi takiben stunning. (Örneğin kardioplejik arrest)
6. Egzersize bağlı iskemi sonrası stunning. (Örneğin yüksek akımlı iskemi)

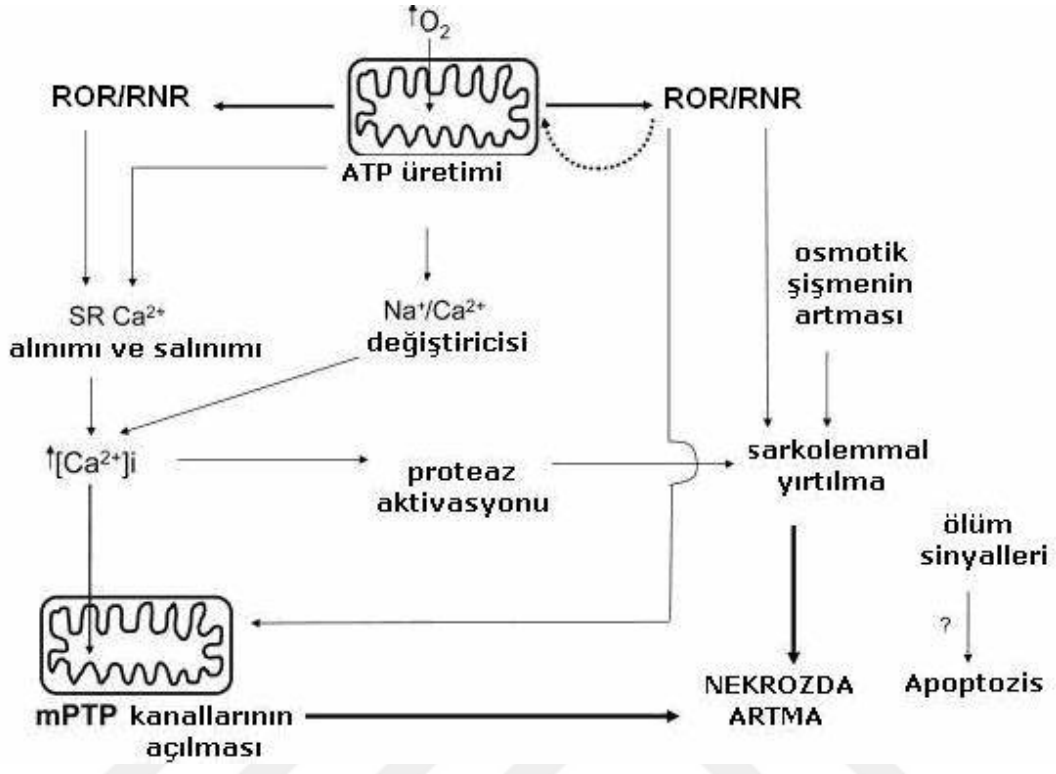
### **2.2.1. Reperfüzyon Hasarının Mekanizmaları**

Aerobik solunum yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon, hipoksinin hücrede ilk etkilediği işlemdir. O<sup>2</sup> basıncının azalmasıyla hücre içi ATP depolarındaki azalma, birçok sistem üzerinde etkili olur. Plazma membranlarında bulunan ATP bağımlı sodyum (Na<sup>+</sup>) pompasının aktivitesi azalır. Bunu, Na<sup>+</sup>'un hücre içinde birikimi ve potasyumun (K<sup>+</sup>) hücre dışına çıkışı takip eder. Na<sup>+</sup> konsantrasyonundaki artış, suyun izootmotik artışına ve akut hücresel şişmeye neden olur. Bu şişme, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitleri gibi diğer metabolitlerin birikimi ile artan hücre içi ozmotik yükü daha da ilerler. Sonuçta; glikojen hızla tükenir, artan glikoliz ise fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimiyle hücrede asidoza neden olur. Ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan (GER) ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma bunu takip eder. Hipoksinin devam etmesi ile mitokondrial fonksiyonun daha da kötüleşmesi ve membran geçirgenliğinin artışı sonucunda morfolojik hasar artar. Hücrenin ana hatlar, mikrovillus gibi ultrastrüktürel özelliklerin kaybı ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşumu ile bozulur. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve tüm hücreler ozmotik regülasyonun bozulmasından dolayı şişmişlerdir. İskemi düzeltilir ve O<sup>2</sup> düzeyleri normale dönerse tüm bu bozulmalar geri dönebilir, ancak iskemi ve hipoksi devam ederse geridönüşümsüz hasar meydana gelir (30).

### **2.2.2. Ca<sup>+2</sup> sitotoksitesi**

Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonunun intrasellüler artışı durumunda normal fizyolojik süreçlerin aşırı stimülasyonu ile nöronal harabiyet oluşur. İskemide ATP kaybı ile hızlı olarak masif intrasellüler Ca<sup>+2</sup> artışı olur. İntrasellüler kalsiyumun artışı nöron içinde Ca<sup>+2</sup>'a bağımlı

birçok enzimin aktive olmasını sağlar. Bu enzimlerin aktivasyonu sonucu genel olarak serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyonu ve protein yıkımına neden olarak nöronun harabiyetine yol açar.



**Şekil 1.** Miyokardiyal iskemi sonrası reperfüzyona bağlı olarak gelişen kardiyak hasara aracılık eden major hücresel mekanizmalar (21).

### 2.2.3. Oksijen Paradoksu ve Reperfüzyon Hasarı

Gerek reperfüzyon ve gerekse reoksijenasyonda ana hasar doku yeniden oksijenle karşılaştığında olmaktadır. Oksijen paradoksu denilen bu durum, miyokardiyal kontraktür gelişimi ve irreverzibl hücre hasarı ile beraber, kreatinkinaz gibi miyokardiyal enzimlerin salınımı ile karakterizedir (31). Deneysel çalışmalar miyokardiyal hasara kendi başına aracılık edebilen iskemik miyokardın reperfüzyonunun oksidatif stres ürettiğini ortaya çıkardılar. Oksidatif stres, yalnız iskemi tarafından oluşturulan hasarı büyük oranda geçen iskemik miyokardiyumu yeniden oksijene etmesini miyokard hasarını bir dereceye kadar oluşturan oksijen paradoksunun bir bölümüdür (32). Oksijen paradoksu Hearse ve arkadaşları tarafından 1973'te yayınlandı (33). Miyokard reperfüzyonu sırasındaki oksidatif stres aynı zamanda reperfüzyonun kalp koruma etkilerini ortadan kaldırarak NO ve hücre içi sinyal molekülünün vücutta kullanılabilirliğini azaltır. Bu etkiler nötrofil birikiminin inhibisyonu, süperoksit radikallerinin inaktivasyonu ve koroner kan akımı gelişimini içerir (34).

#### **2.2.4. Reperfüzyon Hasarında Nötrofil Aktivasyonunun Rolü**

Reperfüzyon inflamatuvar hücrelerin toplandığı ve inflamatuvar mediyatörlerin salındığı hücresel bir reaksiyondur (35). Bu durum, doku hasarının artmasına yol açmaktadır. Nötrofiller inflamatuvar cevabın en önemli bileşenleridirler. Lökositlerin iskemik alanda toplanabilmeleri için, kemotaktik maddeler yardımıyla dokuya doğru çekilmeleri ve endotel ile temas ederek, birtakım aktifleştirici maddeler yardımıyla aktive edilmeleri gerekir. Lökositlerin dokuya geçişi için mutlaka endotel ile temas etmeleri gerekir. Süperoksit anyonunun bu adezyonu artırdıkları gösterilmiştir (36).

#### **2.3. İskemi- Reperfüzyon Hasarının Kalp Üzerindeki Etkileri**

Miyokard iskemisi, miyokardın metabolik gereksinimlerine göre, yetersiz kan akımı ile karakterize bir durumdur. Miyokarda oksijen sunumu ve ihtiyacı arasındaki dengesizlik sonucu oluşan iskemide, dokuda hipoksi ve anaerobik metabolizmaya yol açar (37).

Miyokard iskemisi, aterosklerotik koroner arter hastalığının major sonuçlarından biridir ve koroner arter hastalığıyla ilişkili çeşitli klinik sendromlara yol açar. Anjina pectoris ve miyokard enfarktüsü bunun iki klinik göstergesidir. Miyokard iskemisi aşırı egzersiz, kalp cerrahisi, kardiyak transplantasyonlar, perkütan translüminal koroner anjioplasti gibi çeşitli durumlarda da karşımıza çıkmaktadır (38,39).

İskemi sırasında miyokardın enerji dengesi çabucak bozulur. ATP (adenozin trifosfat) düzeyi azalır, ADP (adenozin difosfat) düzeyi artar. Hücreler ATP üretimini devam ettirebilmek için glikojeni kullanarak glikoliz yapar. Anaerobik şartlarda glikolizin son ürünü olan pirüvat, laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi ile laktata çevrilir. İskeminin uzaması enerji balansını daha da bozar. ADP adenosin ve küçük oranda inosine kadar hidrolize uğrar. Bu işlem sırasında büyük oranda proton üretilir. Hücre pH'nın azalması glikolizi inhibe eder. Ciddi ve uzun süreli iskemide ATP depolarının %80 ve daha fazlası kaybolursa, hücrenin hacim ve iyon bütünlüğünü idame ettirme kabiliyeti kaybolur. Koroner kan akımı yeniden başlamazsa geriye dönüşümsüz miyokard hasarı (nekroz) son noktadır (40,41).

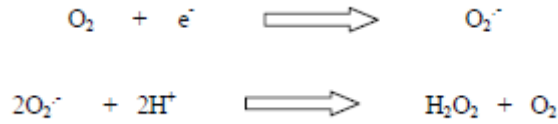
Miyokardiyal iskemide için kritik zaman 20 dk olarak kabul edildiğinden bundan daha kısa süreli iskemilerden sonra sağlanan reperfüzyon durumunda doku hasarının kanıtı bir bulgu saptanmamıştır. 20 dakikadan daha uzun süre devam eden iskemide durumlarında oluşan reperfüzyon hasarı, birbirinden bağımsız etiolojiler sonucunda olmaktadır.

Reperfüzyonun dakikalar ile saatler arasındaki döneminde nekroz ve apoptosis nedeniyle hücre ölümünün artışı gibi farklı nedenler miyokard hasarının artmasına neden olmaktadır (42,43,44).

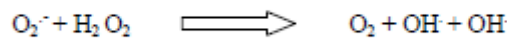
## 2.4. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, son yörüngelerinde eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Elektronlar genellikle atom veya molekülde eşlenik bir şekilde bulunurlar, bu yüzden molekül stabildir ve reaktif değildir. Fakat moleküle bir elektron eklenmesi veya molekülün bir elektron kaybetmesi molekülü reaktif hale getirir. Serbest radikaller kararsız bir haldedirler. Başka bir molekülle etkileşime girerek, son yörüngelerindeki eşlenmemiş elektronu eşleme ve kararlı duruma gelme eğilimindedirler. Böylece bu moleküller herhangi bir molekül ile etkileşime girerek, elektron alırlar veya verirler (45-48).

Süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), oksijen molekülüne bir elektron ilavesi sonucunda meydana gelir ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan aktiviteye sahip bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) vasıtasıyla hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) 'ye indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermez, bu yüzden de tek başına radikal değildir (49).



Hidrojen peroksit, katalaz (KAT) ya da glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri vasıtasıyla nontoksik ürünlere dönüşürken, ferröz demir ( $Fe^{+2}$ ) gibi geçiş metallerinin varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonuyla toksik bir radikal olan hidroksil ( $OH\cdot$ ) radikaline dönüşür. Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir, karşılaştığı moleküllerle çok kısa bir süre içerisinde reaksiyona girer. hidroksil radikali moleküler yapısı ve elektronegativitesi sebebi ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküller ile reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara sebep olur (50).



Serbest oksijen radikallerinin iskemi reperfüzyon hasarındaki rolleri şunlardır;

**Lipit Peroksidasyonu:** Serbest oksijen radikallerinin hücrede neden olduğu en ciddi hasar lipit peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin, serbest radikaller ile oksidasyonuna lipit peroksidasyonu denir. Lipit peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybedilmesine, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlar için geçirgenliğin artması sonucunda hücrenin hasara uğramasına ve içeriğinin açığa çıkmasına sebep olur. Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ oluşturmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, iyon transportunu ve enzim aktivitesini etkiler (51,52).

**Protein Oksidasyonu:** Serbest oksijen radikalleri ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak; metiyonin, sülfoksite; histidin, oksihistidin veya asparajine; tirozin, ditirozine; sistein, disüflitlere dönüşür. Bu dönüşümler protein 7 bağlanma özelliklerinde ve enzimatik aktivitelerinde değişikliklere yol açarak hücre fonksiyonlarda bozulmalara neden olur (51,52).

**Deoksiribonükleik Asit(DNA):** Serbest oksijen radikalleri adenin ve piridin nükleotid moleküllerinin kararlı durumlarının sürdürülebilmesine engel olabilirler. SOR, DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar (53,54).

**Kovalen Bağlanma:** Serbest oksijen radikalleri, aromatik aminler, polisiklik hidrokarbonlar ve nitrozaminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllerle kovalen bağlanmasına neden olarak hücre hasara neden olabilirler (54).

**Kalsiyum:** Serbest oksijen radikalleri, kalsiyum ATPaz enzimlerinin önemli sülfidril gruplarını inaktive eder ve hücre fonksiyonlarına zarar verirler (55).

## **2.4.1.Serbest Radikallerin Etkileri**

### **2.4.1.1.Karbonhidratlara Etkileri**

Serbest radikallerin etkisiyle, monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehid yapısında ürünler oluşur. Okzoaldehidler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağ oluşturabilme özelliklerinden ötürü antimitotik aktivite gösterirler. Bundan dolayı kanser ve yaşlanma gibi olaylarda etkili oldukları düşünülmektedir (56).



#### 2.4.1.2. Lipidlere Etkileri

Serbest radikallerin zararlı etkilerinden en çok etkilenen yapı membran lipidleridir (57). Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona neden olurlar (58-60). Bunun sonucunda membran akışkanlığında bozulma ve permeabilite değişiklikleri meydana gelir (61).

#### 2.4.1.3. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikal hasarlarından ne derece etkileneceği proteinin aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi daha yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenmektedirler (62,63). “Hem” proteinleri de serbest radikallerin oluşturduğu hasarlardan büyük ölçüde etkilenirler, özellikle oksihemoglobin süperoksit ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek methemoglobini oluşturur (64-67). Proteinlerin tiyol gruplarının oksidasyonu, enzim fonksiyonundaki kayıplara, membran iyon ve metabolit transportunda aksamalara ve kontraktıl fonksiyonlarda bozulmalara neden olmaktadır (68). Serbest radikallerin proteinler üzerinde neden olduğu başlıca değişiklikler şunlardır (69);

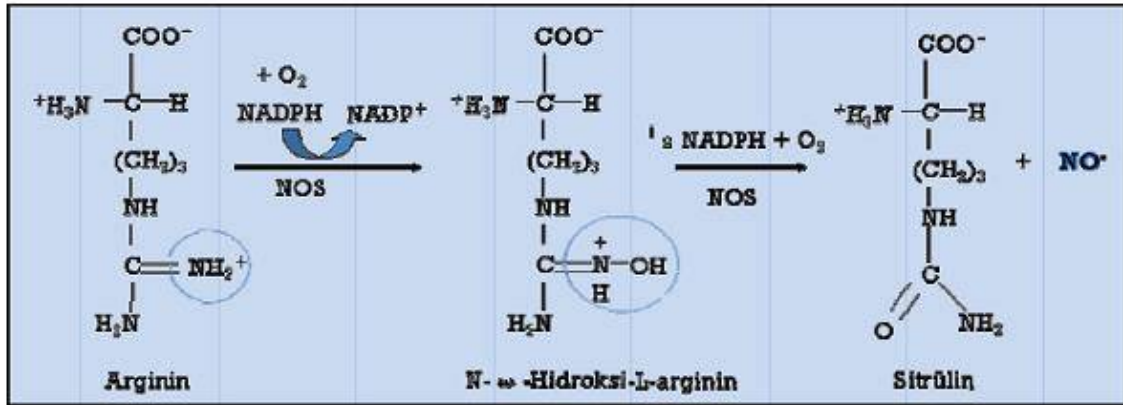
- Aminoasitlerin modifikasyonu,
- Proteinlerin fragmantasyonu,
- Proteinlerin agregasyonu ve çapraz bağlanmalar,

### 2.5. Nitrik oksit

Nitrik oksit (NO) ilk kez 1979 yılında periferel vasküler düz kaslarda güçlü bir gevşetici olarak gösterilmiştir (70). NO, başlıca endotel hücresi, makrofaj, nöron ve düz kas hücresinde L-arginin'den nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile sentez edilen ve molekül ağırlığı 30 olan, renksiz gaz yapısında biyolojik bir moleküldür. Bu molekül biyolojik membranlardan kolaylıkla geçebilen ve eşleşmemiş elektronu olan serbest bir radikaldir. Yarı ömrü 3-5 saniyedir. (71-75).

L-arginin amino asidinden NOS enzimi aracılığı ile NO sentez edilmektedir (Şekil 2). Bu tepkimede substrat olarak NADPH (indirgenmiş nikotinamid nükleotid fosfat) ve  $O^2$  kullanılırken FAD (flavin adenin dinükleotid), BH<sub>4</sub> (tetrahidrobiopterin), FMN (flavin

adenin mononükleotid) ve demir protoporfirin IX (HEM) kofaktör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tepkimede kalmoduline (CaM) ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.L-arjinin aminoasidinden NOS enzimi ile NO sentezi (71)

Bu sentez N-metil-L-arginin, N-nitro-L-arginin ve N-amino-L-arginin gibi L-argininin N-eklenmiş analoglarıyla inhibe edilebilir. NO hemoglobin tarafından inaktive edilir.

## 2.6. Oksidatif Stres

Hücrede oluşan serbest radikaller, "antioksidan savunma sistemleri" olarak ifade edilen mekanizmalarla hedeften uzaklaştırılır. Ancak bazen hücresel savunma mekanizması beraberinde uzaklaştırılan daha fazla serbest radikal meydana gelebilir. Organizmada hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla uzaklaşan daha fazla serbest radikal oluşması oksidatif stres diye bilinir. Hücrede oluşacak oksidatif strese bağlı olarak kalp başta olmak üzere beyin, kemik-eklem, akciğer, deri, göz ve böbrek gibi doku ve organlarda hastalıklar oluşabilir.

### 2.6.1. Antioksidanlar

ROT oluşumu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize etmek için karşılıklı etkileşim halinde olan endergonik ve ekzergonik kaynaklı, çok çeşitli bileşiklerdir. Bu bileşikler gıda kökenli antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler, lipoik asit gibi), antioksidan enzimler (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi), metal bağlayıcı proteinler (ferritin, albümin, laktoferrin, seruloplasmin gibi) ve bitkilerde yaygın şekilde bulunan çeşitli antioksidan fitonütrientlerdir. "Antioksidan" terimi uluslararası kabul edilmiş herhangi bir tanım ile sınırlandırılmamıştır. Gıdalardaki

antioksidanlar “yağlar gibi kolaylıkla okside olabilen materyallerin oksidasyonunu önleyebilen veya geciktirebilen küçük miktardaki maddeler” olarak tanımlanmıştır. Lipidlerin yanı sıra protein, DNA ve karbonhidrat gibi okside olabilen diğer tüm bileşikleri de içeren diğer bir tanım “okside olabilen substratlara kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunan ve substratların oksidasyonunu önleyen veya geciktiren maddeler” şeklindedir (76). Antioksidanların oksidatif reaksiyonlara etkisi farklı şekillerde olabilir (77-79):

a) ROT oluşmasını engelleyen sistemler: Demir ve bakır iyonlarını bağlayan metal şelatörleri, mitokondride doğal olarak oluşan ROT'ları indirgeyen mitokondriyal sitokrom oksidaz gibi.

b) ROT'ları yakalayıp nötralize eden antioksidanlar: Flavonoidler,  $\alpha$ -tokoferol, askorbik asit, metiyonin, ürik asit,  $\beta$ -karoten, indirgenmiş glutatyon, mukus gibi. Bu tür antioksidanlar radikal zincir reaksiyonunun başlamasını inhibe eder veya zincir reaksiyonunun ilerlemesine engel olarak radikal reaksiyonu sona erdirirler.

c) Oluşan radikalleri detoksifiye eden sistemleri: ROT'ları daha az toksik ürünlere dönüştüren enzim sistemleridir. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz.

#### 2.6.1.1. Endojen antioksidanlar

Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki şekilde incelenirler:

1. Enzim olan endojen antioksidanlar: SOD, GPx, Glutatyon S-Transferaz (GST), CAT, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz.

2. Enzim olmayan endojen antioksidanlar: Melatonin, Seruloplazmin, Transferin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Bilirubin, Glutatyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin

#### 2.6.1.2. Eksojen antioksidanlar

$\alpha$ -Tokoferol (Vitamin E),  $\beta$ -karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C) ve folik asit (Vitamin B9) dışarıdan alınan vitamin kaynaklı antioksidanlardır (80,81,31).

##### 2.6.1.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

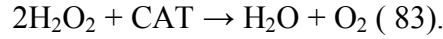
Süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir.



Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde doku hücrelerindeki  $O_2^{\cdot -}$  düzeyleri kontrol altında tutulur (82).

### 2.6.1.2.2. Katalaz

Katalaz (CAT) : Katalaz esas olarak peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. Bir radikal olmamasına karşın SOD aracılığıyla oluşan hidrojen peroksit, reaktif oksijen türlerinden en reaktif olan OH<sup>•</sup> radikalının öncüsüdür. Bu nedenle birçok reaktif oksijen türlerinden daha fazla oksidatif hasara neden olmaktadır. Katalaz hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalar:



### 2.6.1.2.3. Glutasyon Peroksidaz (Gpx) Ve Glutasyon Redüktaz (GR)

Gerek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve gerekse lipid hidroperoksit (LOOH)’leri metabolize etmektedir. Selenyum-bağımlı ve selenyum-bağımsız iki değişik tipi vardır. Selenyum-bağımlı tipi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve LOOH’leri, selenyum- bağımsız tipi sadece LOOH’leri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve LOOH indirgenirken GSH ise okside biçimine (GSSG) dönüşür. Okside glutasyon ise NADPH bağımlı glutasyon redüktaz (GR) tarafından yeniden GSH’a indirgenir. GPx’ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Diğer antioksidanlarla beraber GPx, solunum patlaması sırasında serbest radikal etkisi ile fagositik hücrelerin zarardan etkilenmesini engeller. GPx eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Eritrosit GPx aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelde düşük saptanmıştır. Lökosit GPx aktivitesi ise yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur ( 76).



Şekil 3: İskemide glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın rolü (76)

#### 2.6.1.2.4. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-transferaz (GST) dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda görevleri olan GST'ler farklı endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder (76).

#### 2.6.1.2.5. Glutasyon (GSH)

Tripeptid yapıdaki GSH (L- $\gamma$ - glutamil-L-sisteinil-glisin) oksidatif ve elektrofilik stres ve radyasyona karşı hücrelerin korunmasında önemli görev alır . GSH sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak rol alırken, ROS'a karşı direkt olarak da savunma yapabilir (84).

#### 2.6.1.2.6. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)

E vitamini hücrelerde bulunan ve lipitde çözünebilen bir antioksidandır. Doğada yan zincirlerinin doyunluğu ve metilasyonu bakımından birbirinden farklı  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ve  $\delta$ -tokoferol ile  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ve  $\delta$ - tokotrienol isminde 8 tip Vitamin E bulunur. Plazmada baskın olarak bulunan ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanı ise  $\alpha$ - tokoferoldür. Vitamin E, insan vücudu için esansiyel olan bir antioksidan bileşiktir ve bu nedenle dışarıdan alınması gerekir. Hücre membranının yapısı ve fonksiyonu açısından önemli olan doymamış yağ asitlerinin korunmasında rol oynar (85).

#### 2.6.1.2.7. Vitamin C (Askorbik Asit)

Vitamin C (askorbik asit;  $C_6H_8O_6$ ) altı karbonlu bir laktondur. Memelilerde insan hariç çoğu hayvan bu vitamini karaciğerde ya da böbreklerde (kuşlar ve sürüngenler) glukozdan sentezler. Çilek, portakal, kivi, kırmızı ve yeşilbiber, domates ve patates iyi birer C vitamini kaynağıdır. Vitamin C elektron donörüdür. Bir antioksidan veya indirgeyici ajan olarak C3-C4 bağından iki elektron verir ve serbest askorbat radikalini oluşturur. Bu radikal kararlı değildir ve diğer bileşiklerle reaksiyona girmez. Bu özellikler Vitamin C'yi ideal bir elektron donörü kılar. Askorbik asit memelilerde sekiz farklı enzimin, mayada ise üç farklı enzimin kofaktörü olarak görev alır. İntraselüler olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesi, mRNA translasyonu, intraselüler proteinlerin oksidatif hasara karşı korunması gibi antioksidatif etkileri vardır. Düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu in vitro koşullarda önler. Plazmada sulu fazdaki peroksil radikallerinin süpürülmesi ve lipid peroksidasyon ürünlerinin uzaklaştırılması için birincil antioksidan olarak sayılabilir (86).

#### 2.6.1.2.8. Karotenoidler

Karotenoidler; bitkilerde sentezlenirler, fakat hayvanlar için önemlidirler. Yüksek derecede doymamış izoprenidlerdendir. Çifte bağların konjuge oluşundan kuvvetli renklidirler. Açık sarıdan kırmızıya kadar renkli, birçok bitki ve hayvanlarda bulunan, azot içermeyen, suda çözünmeyen fakat yağlarda ve organik çözücülerde çözünen pigmentlerdir. Birçok sebze, meyve ve çiçeklerin karakteristik renkleri bunlardan ileri gelir. Havuç, mısır, domates, tereyağı, süt, yumurta sarısı ve birçok meyvede bolca bulunur. En yaygın kullanılanı A-provitamini olarak da bilinen  $\beta$ - karoten'dir. A19 vitamininin kendiliğinden antioksidan özelliği bulunmazken,  $\beta$ -karoten antioksidan aktiviteye sahiptir (87)

#### 2.6.1.2.9. Ürik Asit

Ürik asid, serbest radikalle tepkimeye giren ve radikal tutucu olarak rol alan bir molekül scavenger olarak adlandırılır (88).

#### 2.6.1.2.10. Melatonin

Melatoninin kalp-damar sistemi üzerine etkileri reseptör aracılı olan ve olmayan şeklinde iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Melatonin, serebral arterlerde vazokonstrüksiyona; periferel damar yataklarında ise vazodilatasyona neden olmaktadır. Çalışmalarda miyokard infarktüs ve ani ölüm riski olan koroner kalp hastalarında melatonin düzeyleri düşük bulunmuştur (89,90). Benzer şekilde LDL-kolesterol düzeyleri yüksek olanlarda ve ayrıca hipertansif hastalarda da melatonin düzeyleri düşük bulunmuş ve melatoninin kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir (91). Melatoninin vazodilatör etkisinin termoregülasyon yolu ile uykunun indüklenmesindeki rolü önemlidir. Şener ve ark.nın çalışmasında yüksek kolesterol ile beslenen hiperlipidemili hayvanlara melatonin uygulanmasının, antioksidan enzim aktivitelerini artırarak aortada koruyucu olduğu bildirilmiştir (92).

### 2.7. Nitrozatif stres

ONOO<sup>-</sup> oksidatif aktiviteye sahip önemli bir ajandır. 3 mekanizma ile etki gösterdiği düşünülmektedir. Birincisi OH<sup>-</sup> radikaline dönüşerek, ikincisi: ONOO<sup>-</sup> in kendisi güçlü oksidasyon kabiliyetine sahiptir ve molekülleri daha antioksidan sistemin etkisine şans bırakmayacak bir hızla okside etmektedir. Üçüncüsü süresi 1 saniye kadar kısa olduğu için nitronyum iyonuna dönüşerek tirozini 3 pozisyonunda nitratlayarak nitrotirozin (3-NT) meydana getirmesidir(93). Böylece tirozinin fosfatlanması

engellemekte ve hücre sinyalizasyonu bozulmaktadır. Proteinleri, protein olmayan sülfür (SH) gruplarını hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) göre 1000 kat kadar ani şekilde okside etmektedir. Metionin ile reaksiyona girerek α-1 antiproteinazı etkisini kaybetmekte, lipid peroksidasyonuna yol açmakta ve proteinlerdeki halkalı amino asitleri nitro türevlerine dönüştürmektedir (50).

Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında olan ONOO<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>; membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü oluşturmaktadırlar (94).

ONOO<sup>-</sup> in sorumlu tutulduğu pek çok hastalık mevcuttur (93):

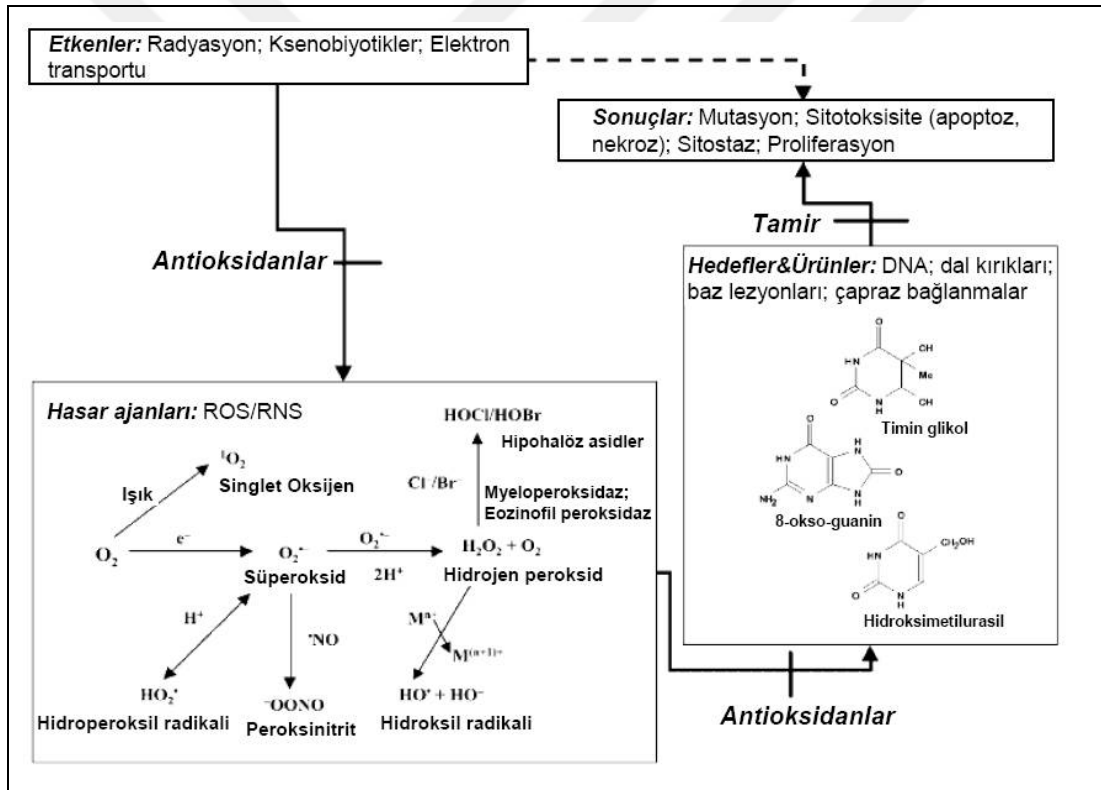
- Ateroskleroz
- Romatoid artrit
- Kardiyovasküler sistem hastalıkları
- Gastrit (H. Pylori enfeksiyonu)
- İnflamatuar barsak hastalıkları
- Deri inflamasyonu
- Akut inflamasyon
- Sepsis

### **2.7.1. Kardiyovasküler Hasarı**

NO hedef hücrelerde çözünür sitoplazmik guanilat siklaza bağlanarak onu aktive etmektedir. Bu enzimin aktivasyonu GTP'den cGMP oluşumunun artmasına neden olmaktadır. Artan cGMP ise kalp kasının gevşemesine ve damarlarda vazodilatasyona neden olmaktadır. NO, ayrıca myositlerin mitokondriyel solunumunu inhibe ederek kalbin oksijen tüketimini azaltmaktadır (94-96). Trombositler endotel kaynaklı NO'dan etkilenebildikleri gibi, kendileri de NO tarafından uyarılabilen eNOS ve guanilat siklaz enzimini bulundurmaları nedeniyle de NO üretebilmektedirler (97). Trombosit içindeki cGMP konsantrasyonunun artması, trombositlerin adezyonunu ve agregasyonunu inhibe etmektedir.

## 2.7.2. DNA Hasarı

Pek çok çevresel faktör gibi, serbest radikal ya da oksidanlar da DNA' da tek zincir kırıkları oluşturabilirler. Organizmada oksidan bir stres yaratan  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ,  $NO$ ,  $HONO$  ve  $ONOO^-$ ; DNA kırıklarına yol açan reaktiflerin başında gelirler (Şekil 4).  $ONOO^-$ ; DNA kırıkları ve enerji azalması ile birlikte, PARS adlı onarıcı bir enzimin hızla aktive olmasını tetikler (Şekil 5). PARS hücre çekirdeğinde bol miktarda bulunan ve adenozin difosfat riboz ünitelerinin homopolimerizasyonunu sağlayan bir enzimdir. PARS hücre içi  $NAD^+$  yi substrat olarak kullandığı için glikolizin ve elektron transportunun yavaşlamasına, dolayısıyla ATP oluşumunun azalmasına ve GAPDH ADP ribozilasyonuna sebep olur. Bu olaylar zincirinin neden olduğu enerji açığına bağlı olarak,  $ONOO^-$  gibi aşırı oksidan stres yaratan durumlar hücrenin disfonksiyonu ve ölümü ile sonuçlanır.

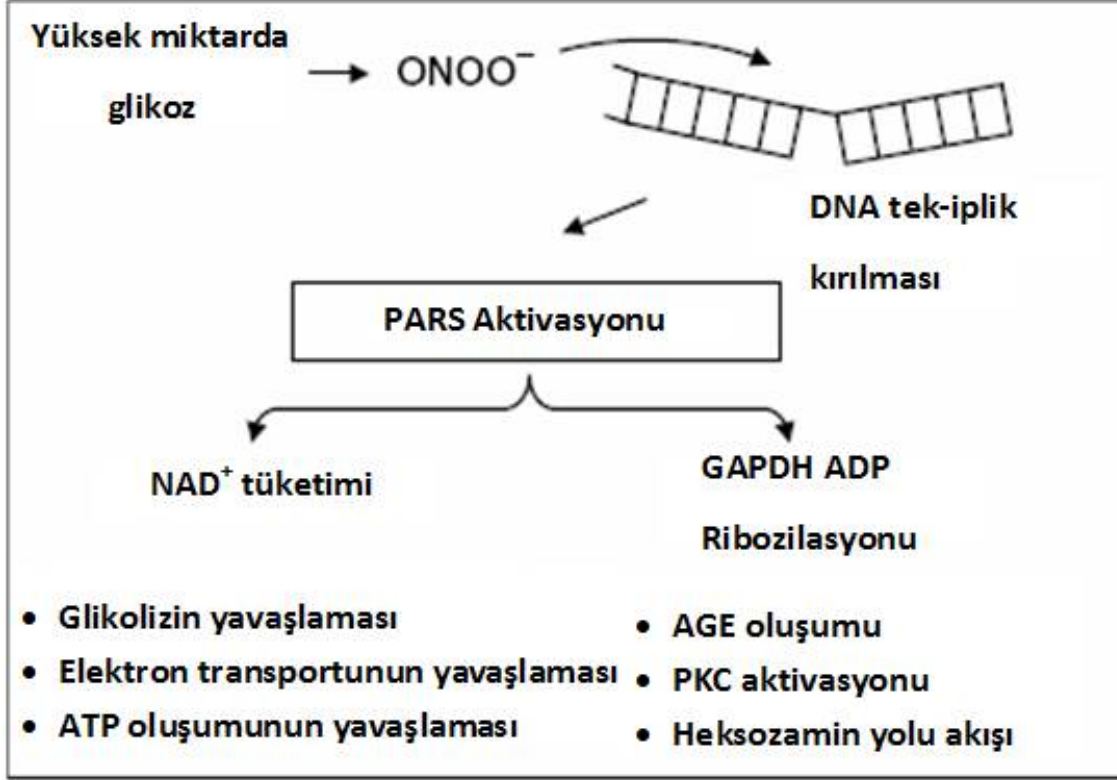


Şekil 4. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı (98).

Yakın tarihli deneyler, hiperglisemi durumlarında, PARS aktivasyonuna bağlı olarak, GAPDH enziminin inaktive olduğunu ve değişim geçirdiğini ortaya koymuştur. Elde edilen kanıtlar, GAPDH'nin, basit bir klasik glikolitik enzim olmadığını göstermiştir. Aksine bu enzim, diyabette hasara neden olan farklı yollarda rol oynayan çeşitli sitoplazmik, membran ve nükleer aktiviteleri bulunan çok işlevli bir proteindir. Protein kinaz C (PKC) izoformlarının aktivasyonu, heksozamin yolu akışı, ileri düzeyde



glikozilasyon son ürünlerinin (AGE'lerin) yapımı ve poliyol yolu akışı, hasar oluşturan yollara örnek olarak verilebilir. GAPDH antisens oligonükleotitlerin kullanılması, bu yolların her birini aktive ederken, aynı zamanda, PJ34 veya INO-1001 gibi rekabet yoluyla PARS'ı inhibe eden maddeler aracılığıyla PARS aktivitesini bloke ederek, damarsal hasarın, hiperglisemi ile indüklenen birden çok yolunu engeller (98).



**Şekil 5.** PARS'ın aktivasyonu. Poli(adenozin difosfat-riboz [ADP]) sentetaz (PARS), DNA içiğindeki kırılmalarla aktive olan nükleer bir DNA onarım enzimidir. Bir kez aktive olunca, PARS, nikotinamid adenin dinükleotitteki ( $\text{NAD}^+$ ) ADP-riboz birimlerinin, nükleer proteinlere tutunmasını katalize eder; böylece  $\text{NAD}^+$ , ADP-riboz ve nikotinamid mononükleotit bileşenlerine ayrılmış olur (98).

### 2.7.3. Nitrozatif Stres Biyomarkırları

#### 2.7.3.1. Nitrik Oksit

Nitrik oksit memelilerde önemli bir sinyal molekülü ve aynı zamanda bir serbest radikal türüdür. Oksijenle çok hızlı etkileşip zehirli etkiye sahip azot dioksit meydana getirebilir. Nitrik oksit hücrel bozukluklarda önemli bir rol oynayan çözünebilir, serbest radikal gazıdır. (99-102). Kan damarlarında bulunan damar endotelial hücrelerinin nonradikal ürünler üretmek için nitrik oksit ile reaksiyona girebilen az miktarda süperoksit

ürettiği de bilinmektedir. Endotelyum tarafından nitrik oksit ve süperoksit üretimindeki bu değişiklik, vasküler özellikleri ve bunun sonucu olarak da kan basıncını düzenleyen bir mekanizma sağlamaktadır. Nitrik oksidin sıtma, kalp hastalıkları, akut inflamasyon, kanser, sinirsel bozukluklar ve şeker hastalığı gibi hastalıklarla da ilgisi ispatlanmıştır. NO• hücre fonksiyonlarının düzeninde ve dokuların yaşam özelliklerinde etkili bir şekilde kullanılır. Nitrik oksit ile süperoksit arasındaki reaksiyon sonucu peroksinitrit (ONOO•) meydana gelir. Oluşan peroksinitritlerin oksidatif DNA hasarlarına yol açtığı bilinmektedir. Peroksinitritin, nitrik okside bağlı bir toksisiteye de sahip olduğu tahmin edilmektedir (102). Aynı zamanda NO• vücut metabolizması için gereklidir. Araştırmalar gösteriyor ki; NO• kan basıncını düşürüyor, kan dolaşımını düzenliyor, damar sertliği başlangıcını veya ilerlemesini geciktiriyor, olası felçleri ve kalp krizi riskini azaltıyor (103).

#### 2.7.3.2 Nitrotirozin (3-NT)

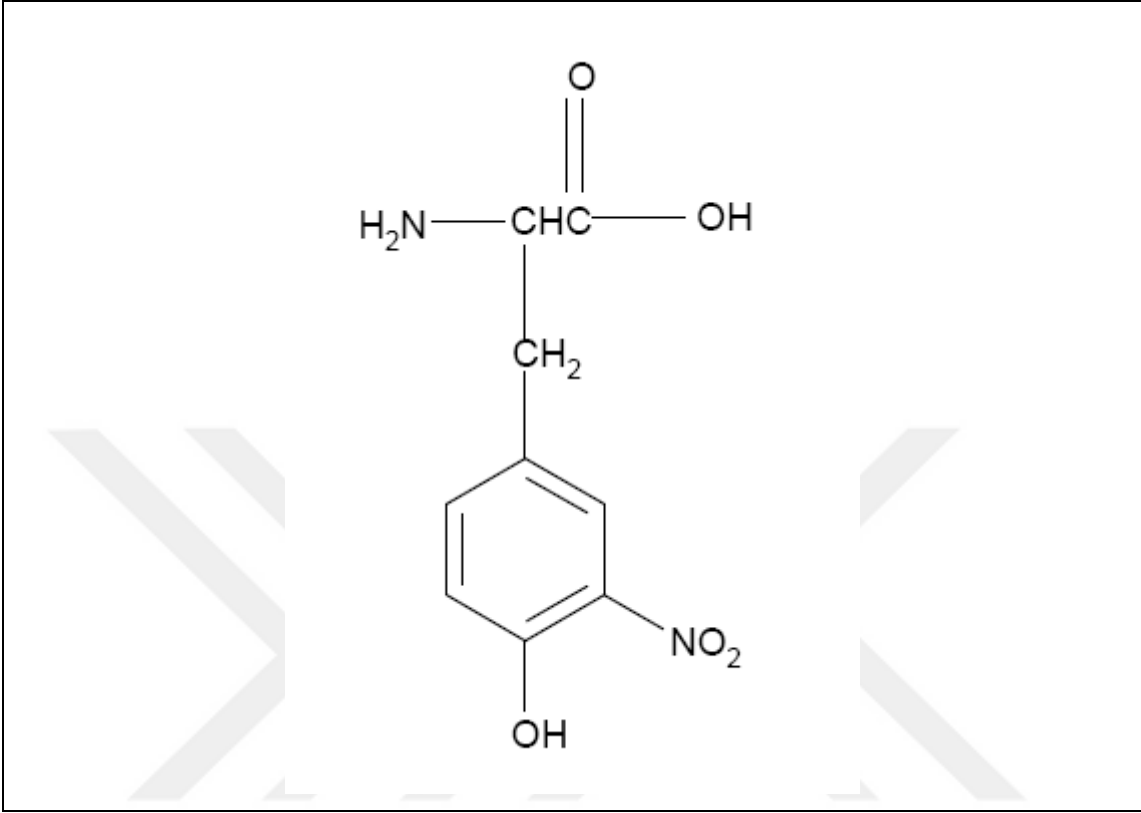
Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle süperoksit grubuna (O<sup>2•-</sup>) indirgenir. Azot oksit radikali de (NO•), farklı ve karmaşık biyolojik süreçlerde yer alan bir diatomik serbest radikaldir. NO• atmosferik azot gazlarının yanma süreci sonunda esas ürün olarak oluşur. Ayrıca, L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile ve reaktif azot türlerinin (RNS) karışımının olduğu midede, asit ile azotun tepkimesi gibi enzimatik olmayan tepkimelerden in vivo olarak üretilebilir (104).

Peroksinitritin kanser hücrelerine karşı savunmada veya parazitler, virüsler, bakteri ve kanserli hücrelerin neden olduğu enfeksiyona karşı, iltihaplı hücreler tarafından üretildiğine inanılır. Fakat peroksinitrit hücrenin kendisine ve dokulara da zarar vermektedir (105).

Peroksinitrit serbest veya proteine bağlı tirozin kalıntısı ile kararlı bir ara ürün olan 3-NT (Şekil 6) oluşturmak üzere tepkime verir. 3-NT bir çok çalışmada, özel bir protein nitratlayıcı ajan olan tetranitrometan uygulanmış deney hayvanlarında, serum proteinlerinde (albumin dahil) doza bağlı artış göstermesi nedeniyle; NO• ortamlı doku tahribini belirlemek için uygun bir işaretleyici olarak önerilmektedir (104).

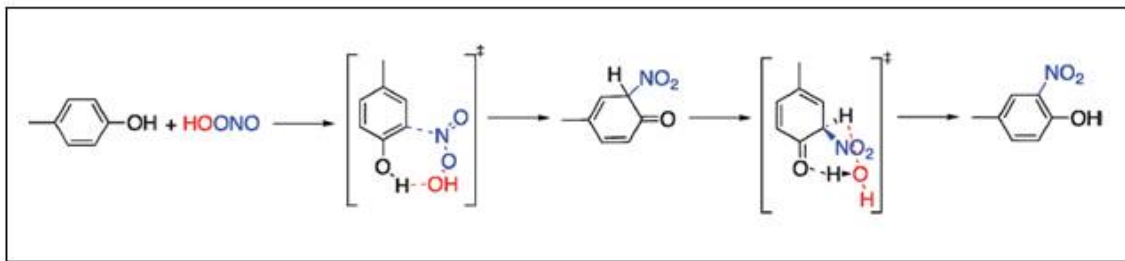
Tirozin, proteine bağlı ya da serbest şekilde bol miktarda bulunmaktadır ve elektrofilik yapılarla önemli ölçüde reaksiyona girer. ONOO<sup>-</sup> ve ONOO<sup>-</sup> deriveli

elektrofiller kolayca fenolik gruplara atak yaparlar ve stabil bir ürün oluştururlar.  $\text{ONOO}^-$ ; serbest veya protein bağlı tirozin rezidülerini 3 pozisyonundan nitratlayarak, 3-NT ürününü yüksek bir verimle oluşturur (106).

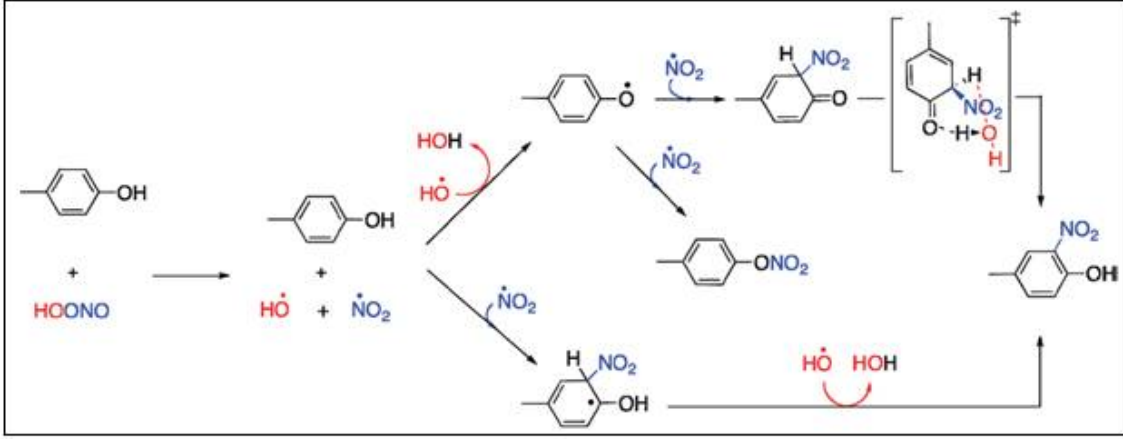


**Şekil 6.** 3-Nitrotirozinin açık yapısı (106).

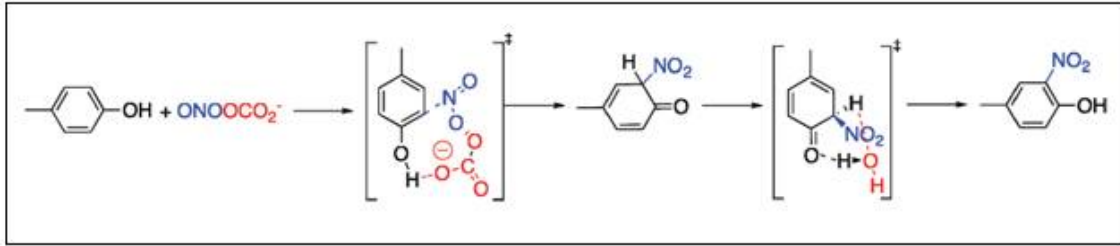
Günaydın ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, p-Metilfenol kullanarak,  $\text{ONOOH}$  ve  $\text{ONOOCO}_2^-$  aracılı tirozin nitrasyon mekanizmasının aşamalarını kaydetmişlerdir (107). Bu mekanizmanın aşamaları **Şekil 7-8-9-10'** de görülmektedir.



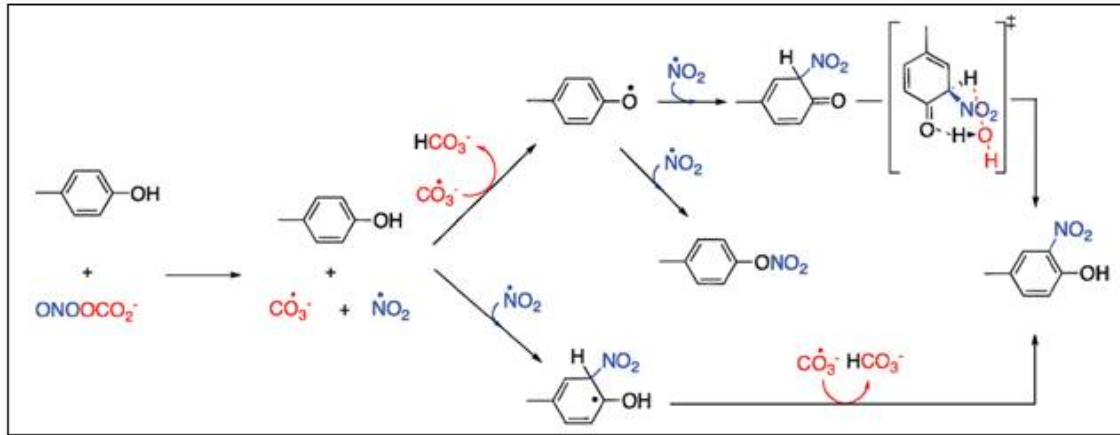
**Şekil 7.**  $\text{ONOOH}$  ve p-Metilfenolün ortak reaksiyonu (107).



Şekil 8. ONOOH ve p-Metilfenolün radikal yol üzerinden reaksiyonu (107).

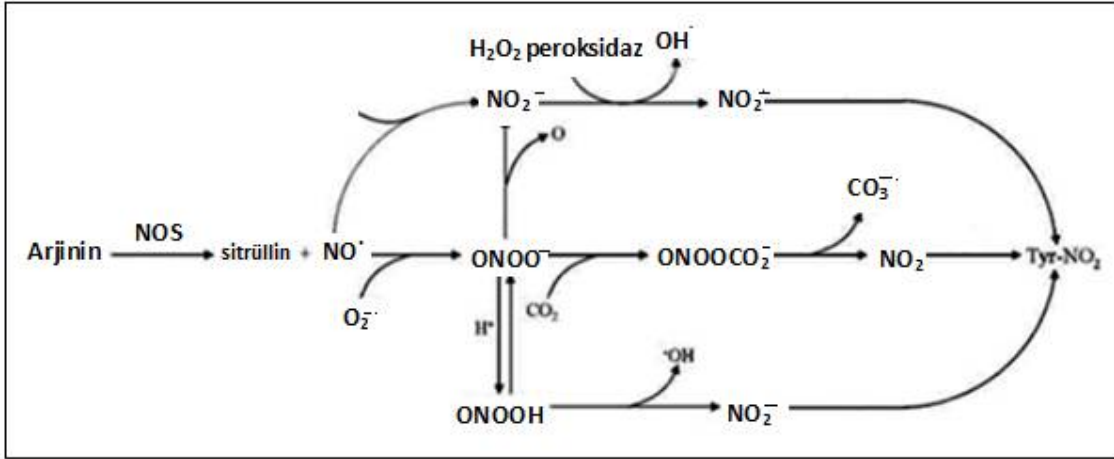


Şekil 9. ONOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> ve p-Metilfenolün ortak reaksiyonu (107).



Şekil 10. ONOCO<sub>2</sub><sup>-</sup> ve p-Metilfenolün radikal yol üzerinden reaksiyonu (107).

Bunlardan başka NO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-•</sup> ye dönüşen NO<sub>2</sub><sup>-•</sup> e okside olabilir. NO<sub>2</sub><sup>-•</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> myeloperoksidaz gibi bir peroksidaz enzimi ile metabolize edilir ve böylece tirozin nitrasyonuna öncülük eden OH<sup>-</sup> ve NO<sub>2</sub><sup>-</sup> meydana gelir (Şekil 11) (107).



Şekil 11. ONOO<sup>-</sup> Aracılı Protein Tirozin Nitrazyon Yolu (107).

## 2.8. Likopen

Önemli bir karotenoid yapısında olan likopen en çok domates (*Lycopersicon esculentum*) olmak üzere karpuz, pempe greyfurt gibi meyve ve sebzelerin yapısında bulunmaktadır. Onlara kırmızı rengi verir (108).

Likopen, sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan karoten ailesine ait bir pigmenttir. Likopen aynı zamanda antioksidan yapısında olan bir maddedir. Likopen, hücreleri serbest radikal hasarından korunmasının yanı sıra, hücreler arasındaki bağları kuvvetlendirmekte ve hücre metabolizmasını geliştirmektedir. Yağda çözünen, yağ miktarı fazla doku ve organlarda aktifliği artan likopen, yağ içeriği oldukça çok olan ciltte de antioksidan koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur. Başka bir yararlı etkisi, ultraviyole ışınlar karşı koruma sağlamasıdır. Likopen aynı zamanda kolesterol düşürücü özelliğede sahiptir. Göğüs, rahim, karaciğer, prostat kanserlerinden koruyan, Alzheimer hastalığını önleyen, kalp damar hastalıkları, kemik ve cilt sağlığı açısından koruyucu etkisi bulunan likopen antioksidan özelliğiyle yaşlanma sürecini de yavaşlatmaktadır (109-111).

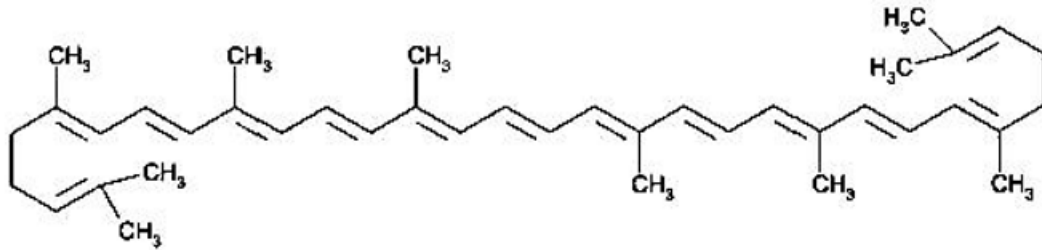
**Tablo 1.** Bitki ve meyvelerdeki likopen içeriği (109).

Meyve ve Bitki	Likopen ( $\mu\text{g/g}$ )
Domates	8.8 – 42
Karpuz	23 – 72
Pembe greyfurt	33
Pembe guavana	54
Papaya	20 – 53
Kayısı	<0.1

İnsanlar tarafından besinlerle alınan karotenoidler, A vitamini prekürsörü olarak işlev yaparlar. Bunların başlıcaları kriptoksantindir. En çok bulunan ve en etkili olanı  $\beta$ -karotendir.  $\beta$ -karoten A vitamini prekürsörü olma özelliği yanında biyolojik önemi lipid oksidantı olması ve özellikle singlet oksijen olmak üzere serbest radikalleri nötralize etmesidir (112).

Karotenoidler, özellikleri ve fonksiyonları onların kimyasal yapısına bağlıdır. Fotosentezde olduğu gibi enerji transfer reaksiyonlarında en önemli faktörün özellikle tekli ve konjuge çift bağlı bir sistemle 40 C ünitesinin ( $\text{C}=\text{C}$ ) kuyruk kuyruğa bağlanması ile şekillenen tetraterpen yapısında uzamaların bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Molekülün bu özelliği singlet oksijen ( $\text{O}_2^-$ ) toplamasına izin verir. Karotenoidlerin bu radikal toplama özellikleri sayesinde çoğu epidemiyolojik çalışmalarla, kanser, kalp rahatsızlıkları, göz hastalıkları gibi ciddi rahatsızlıklara karşı koruyucu etkilerinin görüldüğü gösterilmiştir (113-116).

Likopen tüm karotenoidlerde olduğu gibi asidik  $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$  yapısından türemiştir. 11 konjuge ve 2 konjuge olmayan çift bağlı açık zincirli bir hidrokarbondur (117,118). Likopen provitamin A aktivitesine sahip değildir, insan serumunda da bulunur. Sistemlerde antioksidan olarak daha büyük radikal toplama aktivitesine sahiptir (108).



**Şekil 12.** Likopenin kimyasal yapısı (117).

Son zamanlarda deneysel verilerden sağlanan bulgulara göre insanlar 50 den fazla diyete bağlı karotenoidi absorbe ve metabolize edebilme yeteneğindedir.  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -kriptoksantin, lutein ve likopen insan kanında en bol bulunan karotenoidler arasındadır. Epidemiyolojik çalışmalardan sağlanan delillere göre yüksek oranda karotenoidce zengin meyve ve sebze alınımı insanlarda en yaygın görülen kolon, mide ve prostat kanserine karşı korur (119-121).

Farklı insan dokularında saptanabilen karotenoidler diyet kaynaklıdır. Likopen içeren karotenoidler alındığında, diyetteki lipid miselleri ile birleşir, pasif difüzyon ile intestinal mukoza içine absorbe olur ve buradan şilomikronlar ile birleşerek lenfatik sistem ile karaciğere taşınır. Karotenoidler plazmada şilomikronlar ile taşınarak farklı organlara dağıtılır (122).

Likopenin dahil olduğu diyete bağlı antioksidanların, reaktif oksijen türlerini inaktive ettikleri ve oksidatif hasara karşı koruma sağlayarak, prostat kanserinin engellenmesinde potansiyel moleküller olabilecekleri düşünülmektedir. Ayrıca domates ve domates ürünlerinin bazı kanser tiplerinin ve plazma lipid peroksidasyonunun gelişimi ile ters bir ilişki göstermesi de likopenin antioksidan özelliklerine bağlanmıştır (113,123).

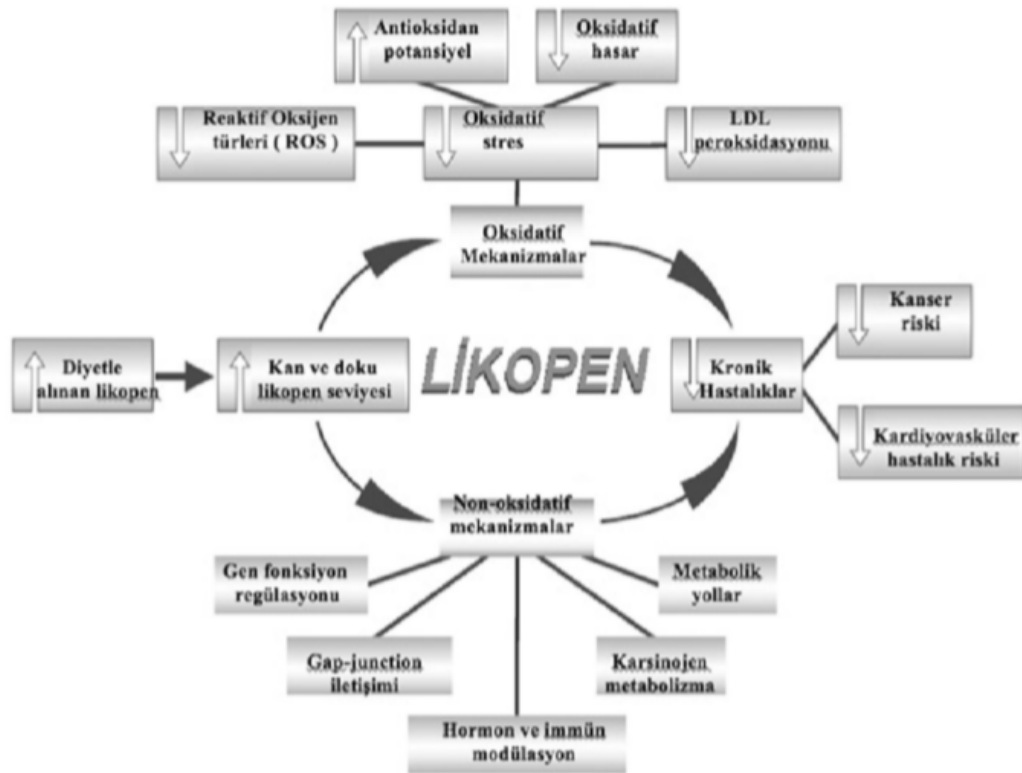
**Tablo 2.** İnsan dokularındaki likopen seviyeleri (123).

Doku	Likopen nmol/g
Testis	4.34- 21.36
Adrenal	1.9 – 21.6
Prostat	0.8
Meme	0.78
Karaciğer	1.28 – 5.72
Pankreas	0.7
Akciğer	0.22 -0.77
Böbrek	0.15- 0.62
Kolon	0.31
Deri	0.42
Ovaryum	0.3
Mide	0.2
Beyin sapı	saptanamamıştır

### 2.8.1. Likopenin Etkileri

Likopenin etkilerini genel olarak üç temel başlıkta sınıflandırabiliriz:

1. Antioksidan etki
2. Antikanserojenik etki
  - a. Hücresel döngüyü durdurucu etki
  - b. Hücrelerarası birleşme yerlerinde (gap-junction) haberleşmeyi arttırıcı etki.
  - c. IGF-1 (serum insülin benzeri büyüme faktörü-1) sinyal iletimini inhibe edici etki.
3. Antienflamatuvar etki



Şekil 13. Likopenin insan sağlığındaki rolü (124).

#### A- Likopenin antioksidan etkisi

Çeşitli stres faktörleri ile açığa çıkan reaktif oksijen ve nitrojen türleri; lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hücre biyomelekülleri etkileyerek osteoporoz, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve sindirim sisteminde akut ya da kronik hastalıklara olan yatkınlığı arttırmaktadır. Bu nedenle antioksidanların besinler yoluyla alınması stratejik moleküllerin oksidatif zarardan korunmasında önemli görev aldığı ileri sürülmüştür (124,125). Plazmanın antioksidan kapasitesinin, antioksidan bileşiklerin konsantrasyonlarına ve sinerjilerine bağlı olduğu saptanmıştır. Bununla oksidatif zarara



karşı savunmada suda çözünen ve lipofilik antioksidanlar arasında gerçekleşen etkileşimden kaynaklandığı saptanmıştır (126).

Karotenoidler diğer serbest radikallerin oluşumuna sebep olan singlet oksijeni ortadan kaldırmada etkilidir (127). Singlet oksijenin giderildiği süreçte enerji likopen molekülüne transfer edilir. Değişim sırasında enerji bakımından zengin bir bileşik oluşur. Bileşikteki likopen fiziksel dönme veya ısınma şeklinde enerji dağılması ile eski haline döner ve başka radikalleri ortadan kaldırmak için hazır biçimde bileşikten ayrılır. Likopenin aynı zamanda biyolojik membran molekülleri içinde lipozomlara benzeyen bir O<sup>2</sup> temizleyicisi olduğunu gösterilmiştir. Likopen in vitro koşullarda güçlü bir antioksidan özellik gösterirken, in vivo ortamlarda DNA, protein ve lipidlerin oksidasyonuna karşı koruyucudur (128). Ayrıca yapılan klinik çalışmalarda domates tüketiminin, insan lökositlerinde oksidatif DNA hasarını engellediği saptanmıştır (129).

### **B- Likopenin antikanserojenik etkisi**

Likopenin antikanserojenik etkilerini üç başlık altında toplamak mümkündür.

I) Hücresel döngüyü durdurucu etki: Yapılan araştırmalarda likopenin prostat kanser hücrelerinin gelişimlerini inhibe ettiği ileri sürülmüştür (130,131). Likopen, hücre gelişimindeki siklin D1'i düzenleyerek hücresel döngüdeki G0/G1 fazı arasında tutukluğa öncülük ettiği saptanmıştır. G0/G1 fazı arasında tutukluk likopen ile tedavi edilen lösemi hücrelerinde ve endometrial kanser hücrelerinde (132). saptanmıştır.

II) Hücreler arası birleşme yerlerinde (gap-junction) haberleşmeyi artırıcı etki: Likopenin hücreler arası birleşme yerlerinde haberleşmeyi artırıcı etkisinin olduğu doku ve homeostazında görev aldığı ortaya konmuştur.

III) IGF-1 sinyal iletimini inhibe edici etki: Serum insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) konsantrasyonundaki artış prostat kanseri gibi kanser tiplerinde görev alır. IGF-1 kan seviyesinin yüksek oluşu akciğer, kolon, rektum ve prostat kanseri risklerinin artışıyla önceden haber veren belirteçlerdendir. Likopen MCF-7 göğüs kanser hücrelerinde uyarılmış IGF-1 artışını önemli derecede düşürmüştür. İnhibisyon gelişimi G1/S hücre döngüsünün ilerlemesinin gecikmesiyle bağlantılıdır. Bu etki IGF-1 bağlayan proteinlerin likopenle düzenlenebileceği fikrini açığa çıkarmıştır. Ayrıca Siler ve ark. (2004), rat prostat kanser modelinde yaptıkları çalışmada besinlere 200 ppm likopen eklenmesi ile prostat tümörlerindeki lokal IGF-1 ekspresyonunun düşürüldüğü saptanmıştır.

### **C- Likopenin antiinflamatuvar etkisi**

Likopen, retinol,  $\alpha$ -tokoferol ve karotenoidlerin radikallerini yok etme kapasitesi önemli antioksidan özelliklerindedir (133). Likopen ve bazı antioksidan vitaminler ile

CRP seviyesini belirleyen sistemik inflamasyon tepkimelerinin arasında ters bir bağlantı bulunduğu belirlenmiştir. Yapılan araştırmalar kanser ve kardiovaskuler hastalıkların inflamasyon ve koagulasyon ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Likopen enfeksiyöz etkenlere karşı savunma mekanizmalarını aktive ederek antiinflamatuvar etki gösterir. Likopen siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini düzenleyerek proinflamatuvar moleküllerden prostoglandin, prostosiklin, tromboksan ve lökotrin sentezini baskılayarak yangıya neden olan reaksiyonları da engellediği öne sürülmüştür (134).



### 3.MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada 24 adet 220-300 gram ağırlığında Wistar-Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar, % 45-55 nem oranı, 23°C oda ısısında tutularak ışık düzeni 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık olacak biçimde düzenlendi. Ratların genel fizyolojik bilgileri Tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 3.** Ratların fizyolojik değerleri.

Ortalama Yaşam	3-4 aylık
Ağırlık	200-300 g
Beden ısısı	37.4 °C
Solunum sayısı	104-152/dk.
Kan basıncı	80—131 mmHg
Kan hacmi /vücut ağırlığı	1/20
Kalp ritmi	200-360(240)/dk
Hemoglobin	16-19
Hematokrit	0.1gr/100ml
Sodyum	320mgr/100mg
Potasyum	17.5-22.0 mgr/100ml

#### 3.1.Deney Grupları

Denekler üç gruba ayrıldı. Tedavi grubuna likopen 50 mg/kg dozunda(1gr/5ml soya yağı içinde çözüldü) uygulandı.Cerrahi işlem öncesi ratlara anestezi ketamin(50mg/kg) intramüsküler enjeksiyon ile uygulandı.

**Grup-1 Kontrol Grubu(n=8):** Sadece iskemi reperfüzyon uygulanan grup. Ratlara uygulanan cerrahi işlemden sonra kalpte 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyona oluşturuldu. Cerrahi işlemden 2 saat sonra ratlar sakrifiye edildi.

**Grup-2 Sham(n=8):** Ratlara uygulanan cerrahi işlemden, iki gün öncesinden başlanarak günde bir kez 1 mL serum fizyolojik (%0,9 NaCl) intraperitoneal olarak verildi ve cerrahi işlemden sonra kalpte 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyona oluşturuldu. Cerrahi işlemden 2 saat sonra ratlar sakrifiye edildi.

**Grup-3 Likopen tedavi grubu(n=8):** Ratlara uygulanan cerrahi işlemden, iki gün öncesinden başlanarak günde bir kez 1 mL Likopen 50 mg/kg/gün intraperitoneal olarak

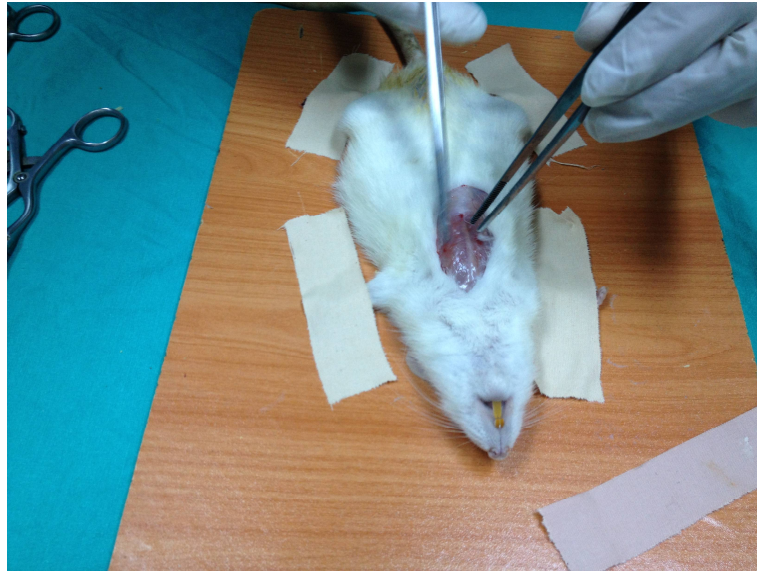
verilmeye başlandı ve cerrahi işlemden sonra kalpte 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyon oluşturuldu. Cerrahi işlemden 2 saat sonra ratlar sakrifiye edildi.

### 3.2.Cerrahi Yöntem

Çalışma KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Ratlar tek tek tartılarak her birine intraperitoneal olarak 50 mg/kg dozunda ketamin hidroklorid verilerek anestezi sağlandı. Anestezi altında ratlara trake entübasyonu uygulandı. Ratların yaklaşık 3 mm olmak üzere 4.ve 5.toraks sol toraktomi yapılarak göğüs kafesi açıldı. Perikardiyum uzaklaştırılıp, abdomene baskı yapılarak kalp nazikçe göğüs kafesi dışına çıkarıldı 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 1mm, uzunluk 15 mm) geçirildi. 15 dakikalık stabilizasyon periyodundan sonra koroner arter etrafına yerleştirilen iplik bir klips yardımıyla sıkıştırılarak ve 10 dakika süreyle geçici bölgesel iskemi yapıldı. İplerin gevşetilmesi ve borunun çıkarılması ile 10 dakika reperfüzyon yapıldı.

Deney sonunda her üç gruptaki ratların kalp dokuları alındı. Dokular ikiye bölünerek bir kısmı biyokimyasal analizler için ayrıldı. Diğer doku parçaları ise kap içerisine alınarak formaldehit ile muhafaza edildi ve histopatolojik değerlendirme için KSÜ Tıp Fakültesi Patoloji Bölümüne verildi.

**Resim 1.** Deneysel Kalp İskemi Reperfüzyon İşlemi-1



**Resim 2.** Deneysel Kalp İskemi Reperfüzyon İşlemi-2



### 3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1,1,3,3 tetrametoksipropan		Sigma
- Bakır sülfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma
- 2-[2-Tiyobarbitürik asit]	TBA	Merck
- Etilendiamin tetraasetik asit	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	Sigma
- Disodyum hidrojen fosfat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Merck
- Sodyum dihidrojen monofosfat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Merck
- Dipotasyum hidrojen fosfat	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Merck
- Potasyum dihidrojen fosfat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck
- Folin-Ciocalteu	Fenol ayırıcı	Sigma
- Glutasyon	GSH	Sigma
- Hidrojen peroksit	$\text{H}_2\text{O}_2$	Merck
- Lauril sülfat	SDS	Sigma
- n-Butanol	1-Butanol	Merck
- Piridin		Merck
- Sodyum hidroksit	$\text{NaOH}$	Merck
- Sodyum karbonat	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Merck
- Sodyum klorür	$\text{NaCl}$	Merck
- Sodyum potasyum tartarat	Na-K tartarat	Sigma
- Tris baz		Sigma
- Tris hidroklorit	Tris-HCl	Sigma

- $\beta$ -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat	$\beta$ -NADPH	Sigma
- Hidroklorik asit	HCl	Merck
- 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
- pH metre	Hanna Instruments
- Hassas Terazî	Radwag
- UV Spektrofotometre	Shimadzu
- Buz Makinesi	Scotsman
- Distile su cihazı	Merck
- Manyetik Karıştırıcı	Mtops
- Cam Kalemi	
- Fotoğraf makinesi	
- Hayvan Kafesi	
- Homojenizatör düzeneği	
- Kronometre	
- Lam	
- Lamel	
- Mezür (25ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml)	
- Mikroskop	
- Operasyon Takımı	
- Otomatik pipet, pastör pipeti	
- Soğutmalı santrifüj	Hettich
-Su Banyosu	
-Vorteks	

### 3.5. Homojenat Hazırlama

Dokuların homojenize işlemine geçmeden önce dokulara 1 gr 9 hacim (hacim/ağırlık) %1,15 KCl çözünme sağlamak amacıyla eklendi. Dokular 16.000 devir/dakika hızda 3 dk boyunca homojenize edildi. Enzim aktive kaybını önlemek amacıyla örnekler buz dolu küvete yerleştirildi. Daha sonra homojenatlar +4 °C'de 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi ve üstteki süpernatantlar alındı ve ependorf tüplere ayrıldı. Ayrılan süpernatantlardan protein, NO, 3-NT ve MDA düzeyleri ile SOD ve CAT enzim aktive ölçümleri yapıldı.

### 3.6. Protein Düzeyinin Tayini

Bu metotta proteinlerin içerdiği tirozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungstik-fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun 750 nm'deki absorban ölçümüne dayanır (135).

#### Ayırıcılar

1. A Çözeltisi:

%2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 g 0.1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. B Çözeltisi

a) B<sub>1</sub> Çözeltisi:

%1 CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 1 g Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

b) B<sub>2</sub> Çözeltisi %2 Na-K tartarat 2 g

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 Cioacalteu 1: 1.5 oranında saf su ile sulandırılır.

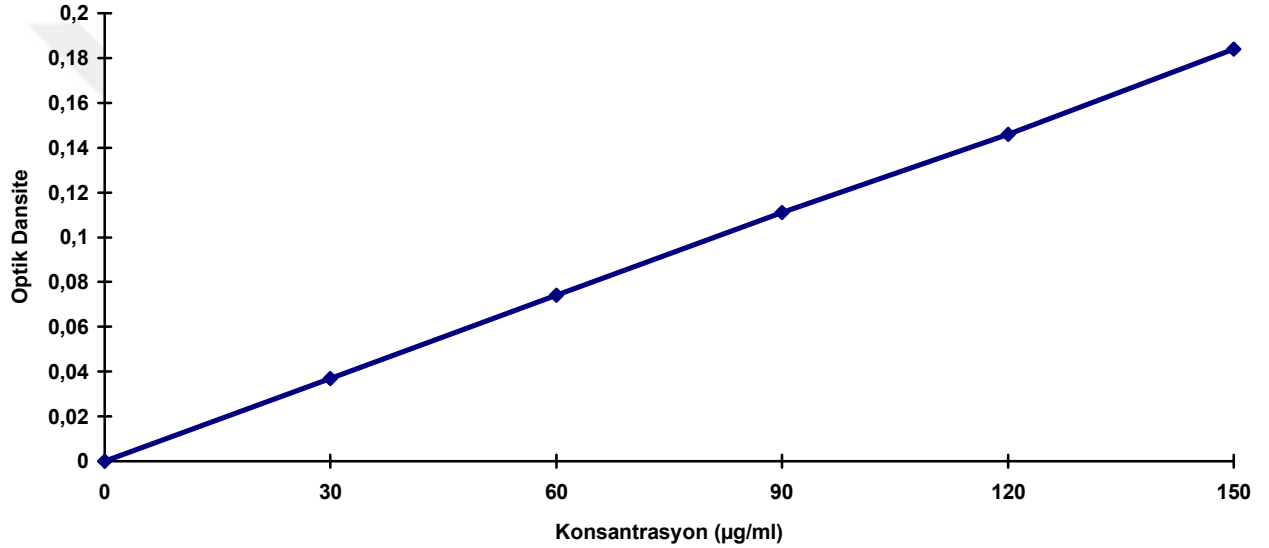
#### Standart Eğri Çizimi

Stok standart için 0.3 g/dl bovin albumin hazırlanır.Hazırlanan stok standarttan 5 ml alınıp 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamalandığında 150 µg'lık konsantrasyon elde edilir.Bundan seri sulandırma ile 150, 120, 90, 60, 30 µg/ml'lik konsantrasyonlar elde edilerek 750 nm'de verdikleri absorbanlar kaydedilir.Bu verilere göre konsantrasyon-absorbans eğrisi çizilir ve her numune ölçümünde standart eğri tekrarlanır.Şekil 14'de protein standart eğrisi verilmiştir.

**Tablo 4.**Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı(135).

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 ısısında 30 dakika bekletilir ve 750 nm'de köre karşı okunur.



**Şekil 14.**Protein standart eğrisi (135).

#### Örnek Çalışması

Kalp dokularından hazırlanan süpernatantta protein tayini için, süpernatant 1:50 oranında serum fizyolojik ile sulandırılır ve protein tayini yapılır. Bunun için üç tüp alınır ve çözeltiler aşağıdaki şekilde konulur.

**Tablo5.**Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı (135).

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Serum fizyolojik	0.3	-	-
Standart	-	0.3	-
Süpernatant	-	-	0.3
C çözeltisi	3	3	3
Oda ısısında 15 dakika bekletilir			
D çözeltisi	0.3	0.3	0.3



Oda ısısında 30 dakika bekletilir, absorbans 750 nm'de okunur.

### **Hesaplama:**

Örneğin absorbansı standartın absorbansı ile karşılaştırılarak veya doğrudan standart eğriden değerlendirilir ve dilüsyon katsayısı ile çarpılarak sonuç verilir.

### **3.7. NO (nitrit+nitrat) ölçüm yöntemi:**

**NO tayini:** Cartos ve Wakid yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü (136).

#### **Gerekli Ayırıklar**

**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'sı 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<sub>4</sub>):** 75 mmol/L; 10.8 mg alınıp 500 ml'ye tamamlandı.

**6-Bakır sulfat (CuSO<sub>4</sub>):** 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<sub>2</sub> standardı 10 mmol/L'lik sodyum tetra borat çözeltisi içinde hazırlandı (69 mg NaNO<sub>2</sub>, 380 mg borat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10 H<sub>2</sub>O) 100 ml içinde çözüldü).

**9-KNO<sub>3</sub> standardı:** 102 mg potasyum nitrat alınıp 10 mmol'lik 100 ml sodyumtetraborat içinde çözüldü.

#### **Deneysel işlemler**

**Deproteinizasyon:** Test tüpüne 0.5 ml distile su, 2 ml ZnSO<sub>4</sub>, 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<sub>4</sub> içinde çalkalanarak bekletilip, 3 defa da Glisin-NaOH ile yıkanıp 10 dk. içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutuldu.

**Sonucun hesaplanması:** KNO<sub>3</sub>' 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

tümtüplerin üzerine konuldu. 90 dk. oda ısısında karıştırılarak 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<sub>2</sub> 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 (136).

### **3.8. Nitrotirozin (3-NT) Düzeyi**

Rat kalp dokusunda 3-NT düzeyleri ELİZA cihazında ticari kit (Rat-3-Nitrotyrosine (NT) Elisa Kit, Cusabio) yardımıyla 450 nm 'de ölçüldü. (Kit referans aralıkları 0.156 ng/ml-10ng/ml, sensitivitesi: 0.038 ng/ml)

### **3.9. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini**

Aerobik şartlarda pH 3.40'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90-95 °C'de inkübasyonu sonucu oluşan lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (137).

#### **Ayırıcılar**

##### **1. %8.1'lik SDS**

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) 8.1 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

##### **2. %20'lik Asetik Asit (HAc)**

Asetik asit 20 ml

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

##### **3. %0.8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA)**

Tiyobarbitürik asit 0.8 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Doymuş NaOH ile pH: 3.5'e ayarlanır.

4. n-Butanol/Piridin (nBu/Pri) Çözeltisi (14/1)

n-Butanol	14 ml
Piridin	1ml

5. Stok Standart

1.1.3.3 tetramethoksiopropan (yoğunluk= 0.99 g/ml)

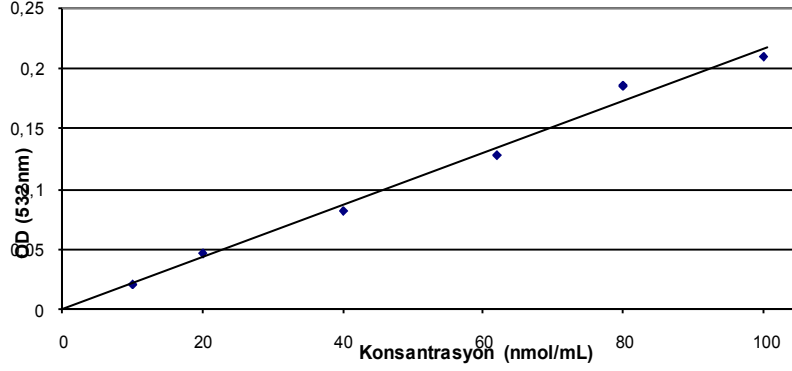
**Standart Eğri Çizimi**

Standart eğri çizimi yapılırken stok sandarttan 6,6 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart hazırlanır. Daha sonra 10,20,40,60,80 ve 100 nmol/ml konsantrasyonunda çalışma standartları hazırlanır. Ayraçlar tüplere aşağıda belirtildiği şekilde ilave edilirler.

**Tablo 6.** MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı (137).

Tüp 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.							

Tüpler n-Butanol /Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım (üst faz) alınarak 532 nm'de absorbans fotometrik olarak okunur ve standart eğri grafiği çizilir (Şekil 15).



**Şekil 15 :** MDA(Malondialdehit) standart eğrisi grafiği (137).

Dokuda MDA düzeyinin tayini için örnek çalışması yapılırken de yukarıdaki tabloda verildiği gibi tüpler belirli hacimde hazırlanır, doku örneği alınır ve MDA tayini yapılır. Ayrıntılı bilgi tablo 7’de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı (137).

	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

Tüpler n-Butanol /Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım(üst faz) alınarak 532 nm’de absorbans fotometrik olarak okunur. Sonuç standart eğrisinden değerlendirilir.

### Hesaplanması

nmol/ml olarak ölçülen MDA düzeyi nmol/mg protein olarak verilmiştir.

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

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

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (piyodonitrotetra zolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır, buaradaki farkın belirlenmesiyle de SOD aktivitesi ölçülür (138) .

#### Ayrıçlar

#### 1. CAPS Tamponu(3-sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit) (pH:10.2)

50.00 mM CAPS 1.1065 gr

0.94 mM EDTA 0,035 gr

Doymuş NaOH 11.1 µl

Saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.

#### 2. Substrat Karışımı

0.05 mM Ksantin 0.00152 gr

INT 0.00253 gr

Bu karışım CAPS tamponuyla 100 ml'ye tamamlanır.

#### 3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz

50 Ü Ksantin oksidaz 3.04 µl

Saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.

#### 4. 0.01 MFosfat 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 su ile 100 ml 'ye tamamlanır.

#### 5. Standart (S6): 5,6 Ü/ml SOD içeren Ransod kitinin standardıdır.

#### Standart Eğri Çizimi

Liyofilize (hızlı dondurulmuş, mikroorganizma içermeyen, steril) olarak hazırlanmış SOD standardı 10 ml bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla Tablo 9'deki gibi hazırlanır. 2-8°C'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

**Tablo 8.** SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı (138).

Kullanılacak Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	M Fosfat Tamponunun Hacmi	SOD derişimi (Ü/ml)
S5	5 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)

Yöntem de; süperoksit dismutaz aktive tayini yapılırken, kalp doku hücrelerinden hazırlanan süpernatantlar %30 ile %60 arasında % inhibisyon aralığı olacak şekilde 0.01 M fosfat tamponu ile 1:65 (640 mikrolitre tampon,10 mikrolitre örnek) oranında sulandırılır ve aktivite tayini yapılır.

**Tablo 9.** SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı (138).

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

Ksantin oksidaz eklendikten sonra tekrar karıştırılır 30 saniye sonra çalışma körünün ve standardın 37 °C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbansları (A<sub>1</sub>) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbansları (A<sub>2</sub>) tekrar okunur.

### Hesaplama

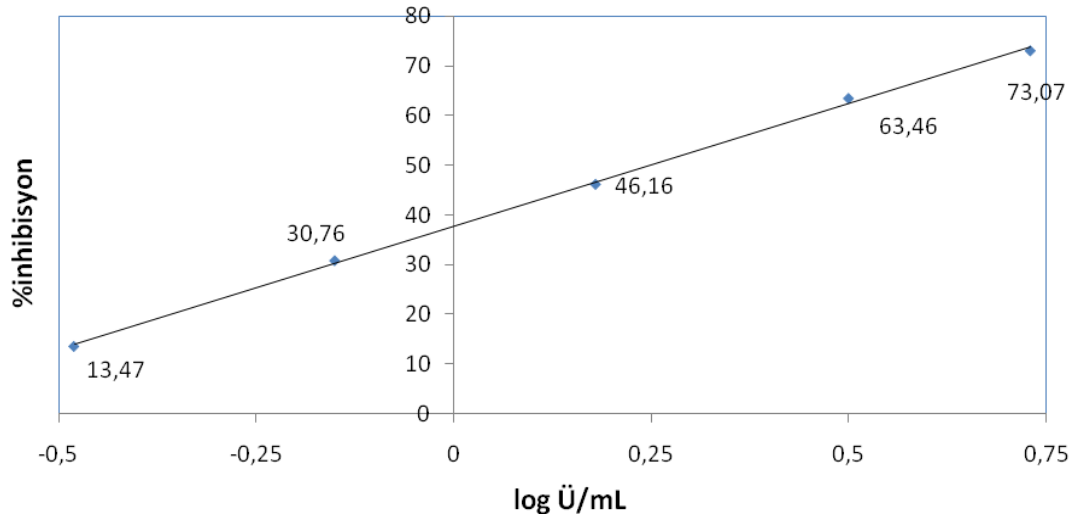
Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körüyle oranlanarak hesaplama yapılır.

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

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

$$\Delta A \text{ çalışma körü}$$

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logoritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhibisyon değeri yazılarak standart eğri elde edilir.



Şekil 16. SOD standart eğrisi (138).

### Örnek Çalışması

Tablo 10. Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı (138).

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

Tüpler tekrar 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:

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

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

$$\Delta A \text{ çalışma körü}$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanılarak bulunur. Ü/ml biriminden ölçülen SOD aktivitesi Ü/mg protein birimi olarak verilmiştir.

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

### 3.11. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Katalaz,  $H_2O_2$ 'nin yıkımını katalize eder.  $H_2O_2$ 'nin CAT tarafından yıkım hızı,  $H_2O_2$ 'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir (139).

#### Ayırıcılar

##### 1. 1M Tris-HCl, 5mM $Na_2$ EDTA tamponu, pH 8.0

Tris-Baz	5.358 gr
Tris-HCl	8,787 gr
$Na_2$ EDTA	0.1461 gr

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

##### 2. 1 M Fosfat tamponu, pH 7.0

$K_2HPO_4$	6.723 gr
$KH_2PO_4$	8.344 gr

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

##### 3. 10 mM $H_2O_2$

%30' luk peroksitten 10  $\mu$ l alınır ve 9.990  $\mu$ l saf suyla tamamlanır.

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

#### Yöntem

Katalaz aktivite tayini için, doku süpernatanı 1:50 oranında saf su ile sulandırılır ve 1 ml'sine 20  $\mu$ l saf etanol ilave edilir, karıştırılır ve aktivite tayini yapana kadar tüplerin ağzı kapalı bekletilir. Deneye başlamadan önce, günlük olarak hazırlanan 10 mM  $H_2O_2$  konsantrasyonunun doğru ayarlanıp ayarlanmadığı fosfat tamponu ile kontrol edilir. Bunun için fosfat tamponu 1:10 oranında saf su ile sulandırılabilir. Ayarlanma yapılırken 1ml'lik küvete 900  $\mu$ l saf su 100  $\mu$ l fosfat tamponu koyulur karıştırılır ve bu karışımın 900  $\mu$ l' 230 nm'de fotometrik olarak okunur  $OD_1$  olarak kaydedilir. Daha sonra aynı küvete hazırladığımız 10 mM 'lık peroksitten ( $H_2O_2$ ) 100  $\mu$ l koyulur ve tekrar okuma yapılır absorbans değeri  $OD_2$  olarak kaydedilir.  $OD_2-OD_1= 0.071$  olmalıdır. Bu değer bulunduktan sonra hazırlanan peroksidin konsantrasyonu tam 10 mM'dır denilir ve deneye aşağıda gösterildiği gibi başlanır.



**Tablo 11.** Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı (139).

	Kör (µl)	Numune (µl)
1M Tris-HCl, 5mM 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.		
Örnek (sulandırılmış)	20	20

Tüpler 37 °C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra daha önce 1:50 oranında dilüe ettiğimiz örnekten 20 µl alınarak tüplere ilave edilir ve 230 nm’de 2,5 dakika kinetik okuma yapılır. Her numune teker teker çalışılarak kaydedilir.

#### Hesaplama

$$\text{CAT Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{0.071 \times V_H (0.02 \text{ ml})}$$

ΔOD: Dakikadaki optik dansite değişimi

VH: Örnek hacmi

VT: Toplam hacim

0.071: 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yıkım hızının verdiği OD değeridir.

Ü/ml biriminden ölçülen CAT aktivitesi örnekte saptanan protein değerine bölünerek dokudaki enzim spesifik aktivite sonucu Ü/mg protein biriminden verilir.

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

### 3.12. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik inceleme için, dokular % 10’ luk tamponlu nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Örneklerin tümü doku takip cihazında rutin takibe alınarak parafin bloklar hazırlandı. Bu parafin bloklardan mikrotom ile her doku örneği için 5 µm’lik 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 içinden rastgele seçim yapılarak gerçekleştirildi. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile histopatolojik incelemeye tabi tutuldu. Gruplar; miyokardiyal ödem, myositolizis, fokal hemoraji ve PNL infiltrasyonu göre

değerlendirildi. Patolojik skorlama; 0-yok, 1-hafif, 2-orta ve 3-şiddetli olarak değerlendirildi.

### **3.13. İstatistiksel analiz**

İstatiksel analizin yapılmasında SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 kullanıldı. Sonuçlarımız ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verildi. Biyokimyasal verilerimizin değerlendirilmesinde ise gruplar arasındaki farkların incelenmesi için Non Parametrik Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Her iki test içinde  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



#### 4- BULGULAR

Ratlarda oluşturulan kalp I/R modeli her grupta 8 adet rat olmak üzere 3 grup ve toplamda 24 adet rat üzerinde çalışıldı. Deney süresince gruplarda herhangi bir kayıp yaşanmadı. Tüm gruplardaki ratlara ait kalp dokusunda oksidatif/nitrozatif stres biyomarkırların düzeyleri Tablo 12 ve Grafik 1-5’de verilmiştir.

**Tablo 12.** Tüm Gruplarda Oksidatif/Nitrozatif Biomarkır Sonuçları

	<b>Kontrol</b>	<b>Sham</b>	<b>Tedavi</b>
<b>CAT (Ü/mg protein)</b>	4,37±1,82	5,18±2,20**	7,13±2,17*
<b>SOD (Ü/mg protein)</b>	3,95±1,05	5,83±2,47**	7,51±3,15*
<b>MDA (nmol/mg protein)</b>	0,52±0,13	0,39±0,10	0,12±0,09*
<b>NO (µmol/mg protein)</b>	18,02±7,05	11,25±2,08	9,74±3,19*
<b>3-NT (nmol/L)</b>	6,03±2,18	4,01±1,64**	3,65±1,02*

\*Tedavi grubunda CAT, SOD, MDA, NO ve 3-NT düzeyleri kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı farklılıklar saptandı (p<0,05).

\*\*Kontrol grubu ile sham grubu kıyaslandığında CAT, SOD ve 3-NT yönünden anlamlı farklılıklar saptanmamıştır (p>0,05).

#### İstatistik Sonuçları

Oksidatif ve nitrozatif stres biyomarkırlarının düzeyleri ilgili verilerimizin değerlendirilmesinde ise gruplar arasındaki farkların incelenmesi için Non Parametrik Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Her iki test içinde p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilerimiz ile ilgili istatistik sonuçları aşağıda sunulmuştur. Bunlar;

##### 1-Katalaz ile ilgili istatistik Sonuçları

Tedavi grubunda CAT aktivitesi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede yüksek iken (p: 0,002), kontrol ve sham gruplarında anlamlı derecede düşük bulundu (p:0,001). Ancak, sham ve kontrol grupları arasında CAT aktivitesi yönünden anlamlı farklılıklar gözlenmedi (p:0,123).

##### 2- Superoksit Dismutaz ile ilgili istatistik Sonuçları

Tedavi grubunda SOD aktivitesi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede yüksek iken (p: 0,018), kontrol ve sham gruplarında

anlamli derecede dusuk bulundu (p:0,042). Ancak, sham ve kontrol gruplari arasinda CAT aktivitesi yonunden anlamlı farklılıklar gözlenmedi (p:0,137).

### 3-Malondialdehit ile ilgili istatistik Sonuçları

Tedavi grubunda MDA düzeyi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede düşük iken (p: 0,001), kontrol ve sham gruplarında anlamlı derecede yüksek bulundu (p:0,028). Üstelik, sham ve kontrol grupları karşılaştırıldığında kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek MDA düzeyi saptandı (p:0,034).

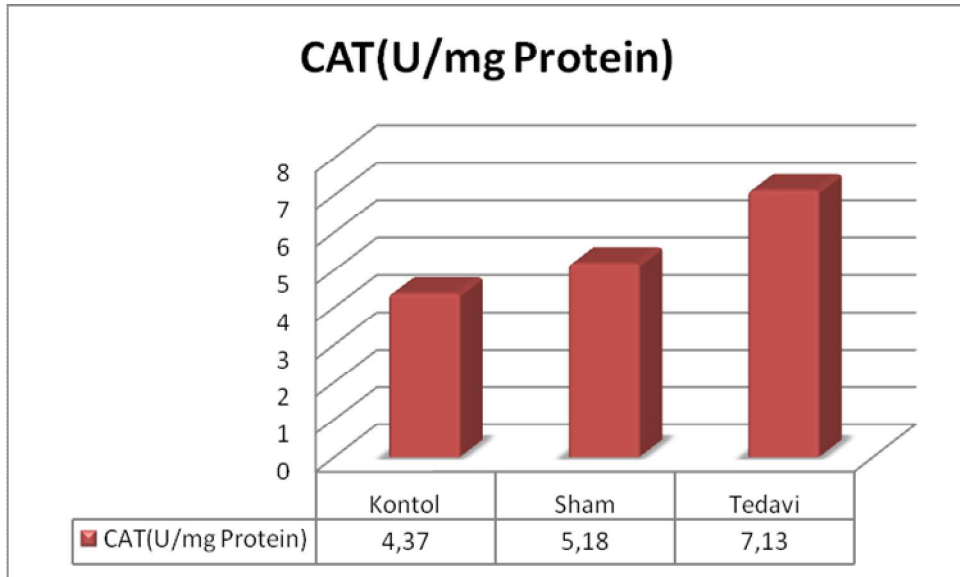
### 4- Nitrik Oksit ile ilgili istatistik Sonuçları

Tedavi grubunda NO düzeyi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede düşük iken (p: 0,009), kontrol ve sham gruplarında anlamlı derecede yüksek bulundu (p:0,017). Ancak, sham ve kontrol grupları arasında NO düzeyi yönünden anlamlı farklılıklar gözlenmedi (p:0,248).

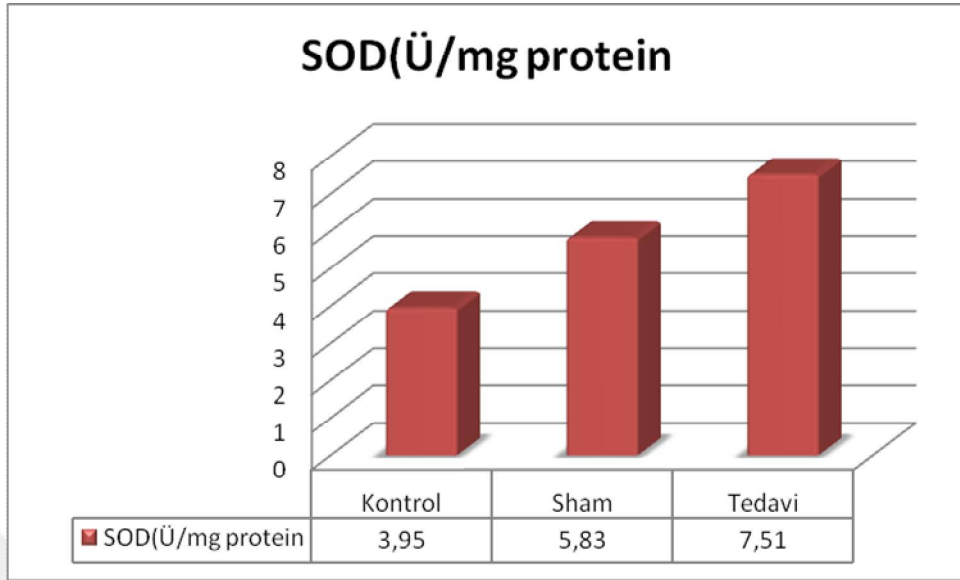
### 4- Nitrotirozin ile ilgili istatistik Sonuçları

Tedavi grubunda 3-NT düzeyi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede düşük iken (p: 0,001), kontrol ve sham gruplarında anlamlı derecede yüksek bulundu (p:0,001). Ancak, sham ve kontrol grupları arasında 3-NT düzeyi yönünden anlamlı farklılıklar gözlenmedi (p:0,346).

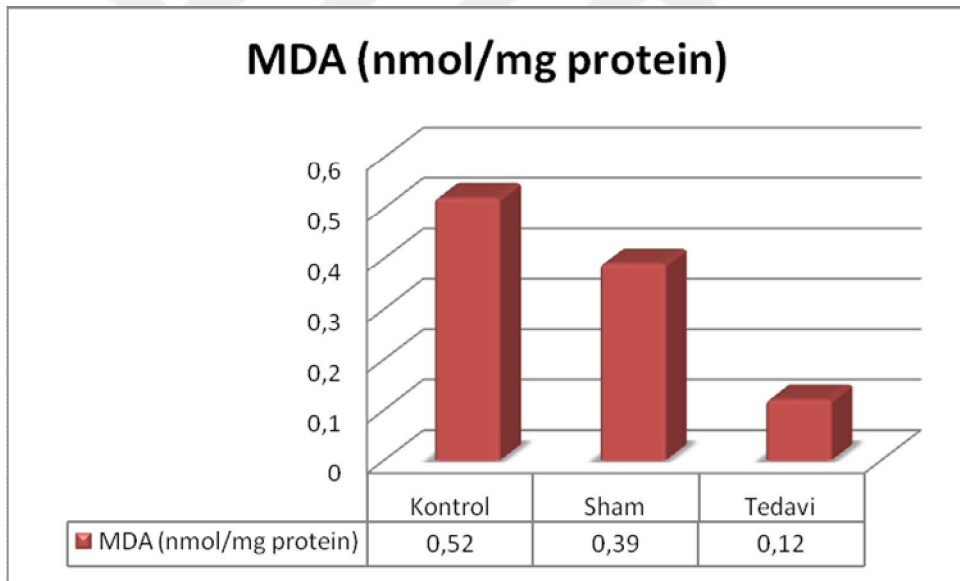
**Grafik 1.** Gruplar Arası CAT Aktiviteleri



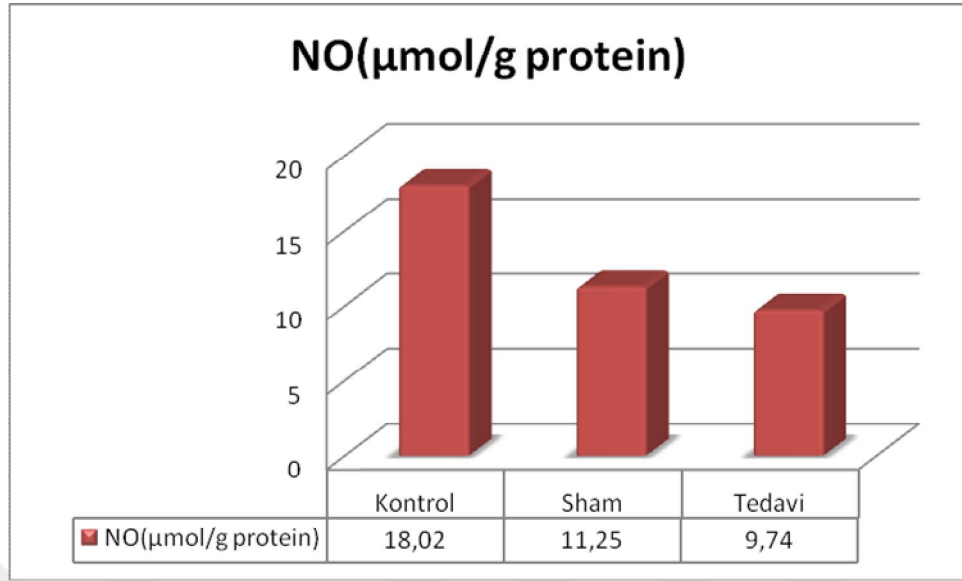
**Grafik 2.** Gruplar Arası SOD Aktiviteleri



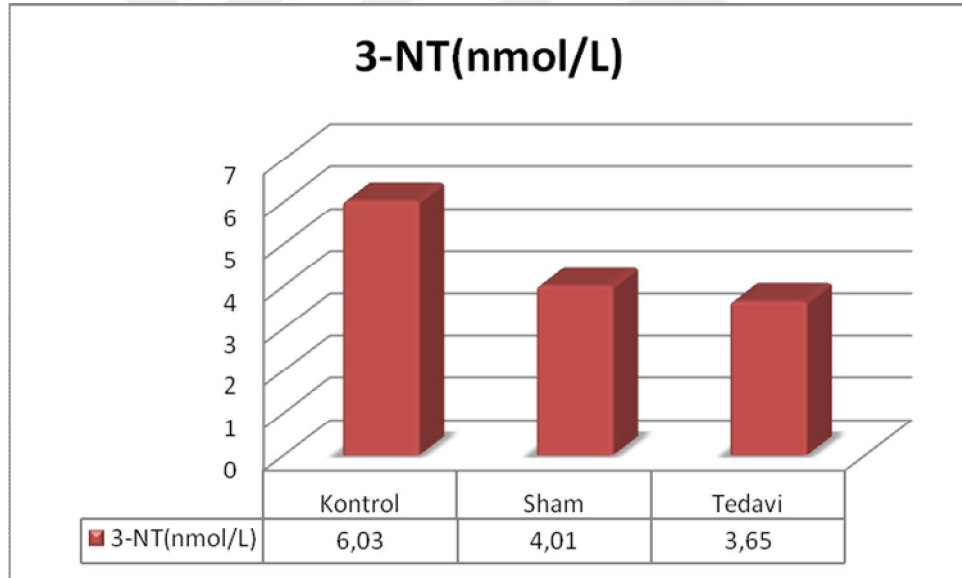
**Grafik 3.** Gruplar Arası MDA Düzeyleri



**Grafik 4.** Gruplar Arası NO Düzeyleri



**Grafik 5.** Gruplar Arası 3-NT Düzeyleri

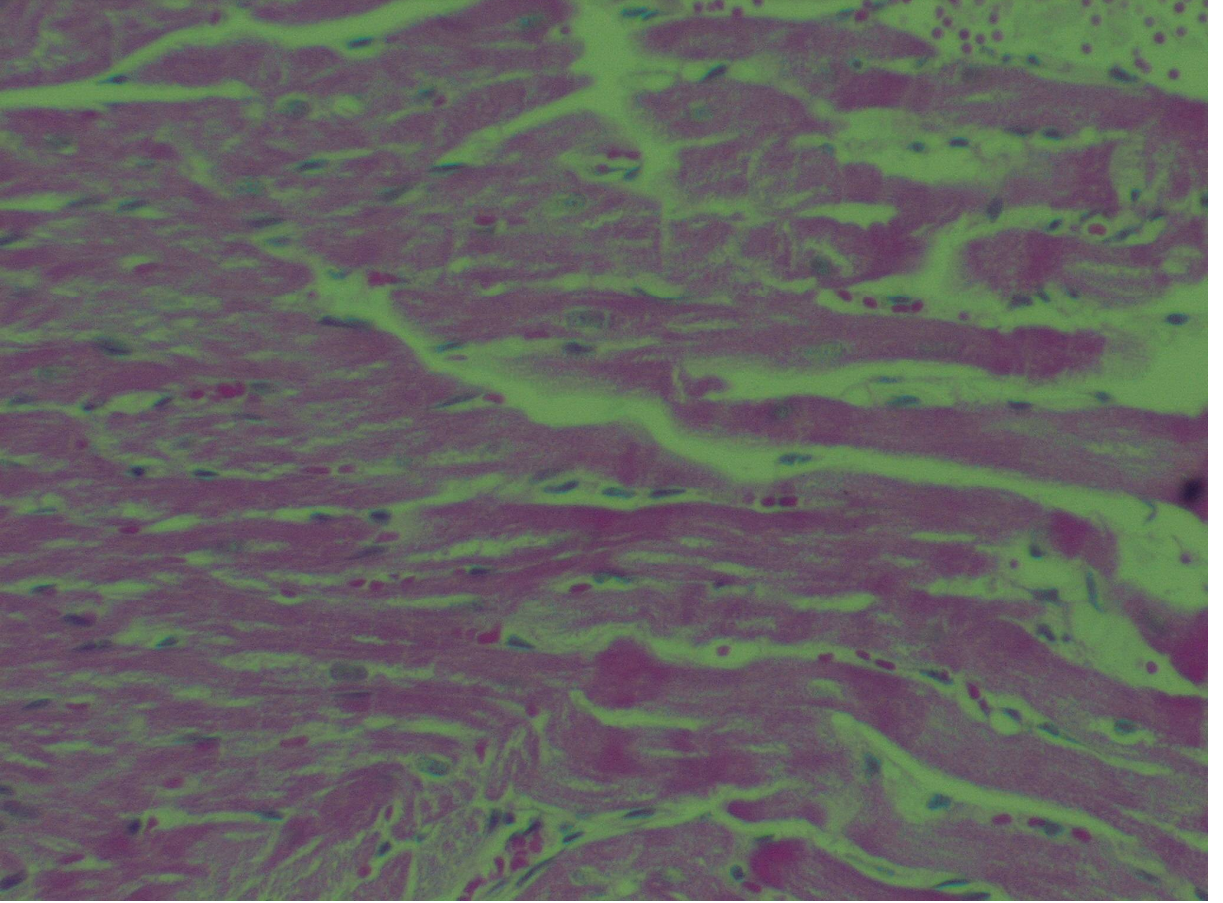


**Tablo 13.**Grupların histopatolojik derecelendirilmesi.

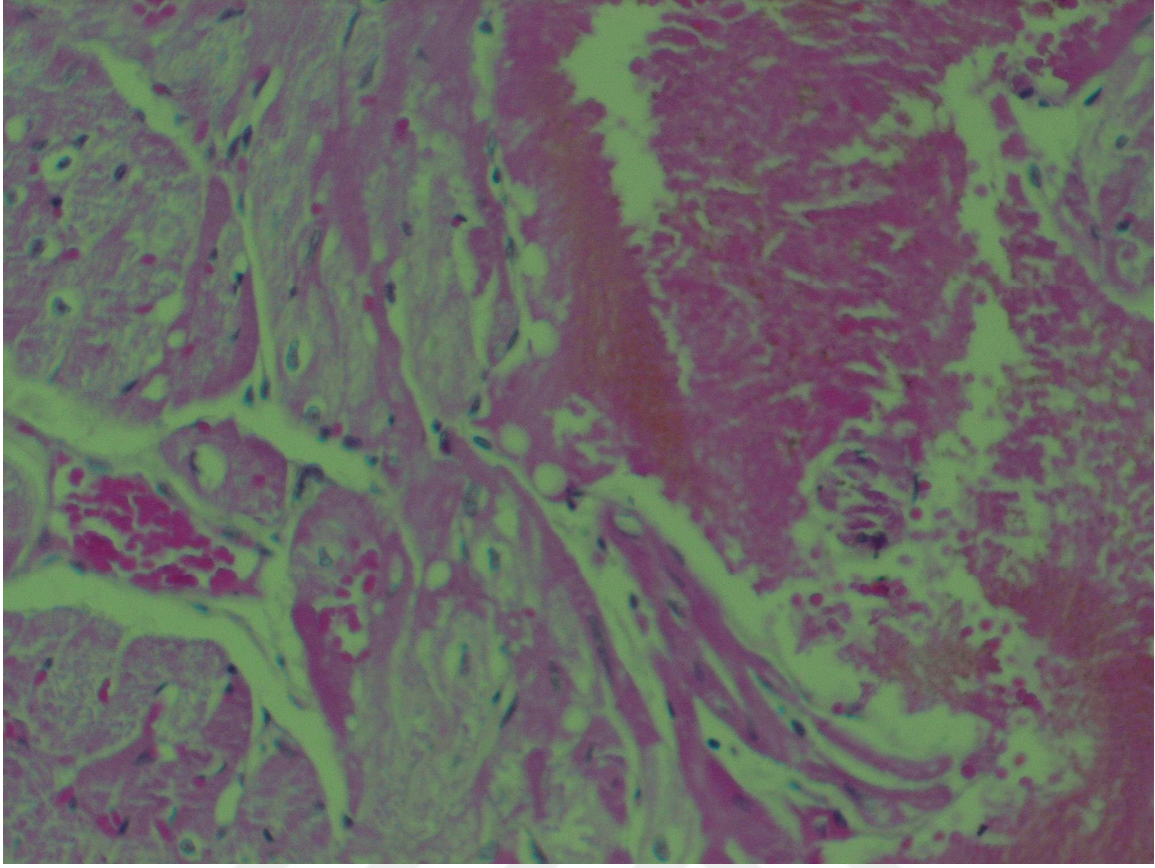
	Miyokar.ödem	Miyositolizis	Hemoraji	PMNL infiltrasyonu
Kontrol	1	1	1	3
Sham	1	1	1	1
Likopen Tedavi	0	0	1	0

Kontrol ve Sham grubunda; Miyokardiyal ödem (p=0.303) Miyositolizis (p=0.602) Hemoraji (p=0.407) PMNL infiltrasyonu (p=0.027) İstatistiksel olarak anlamlı fark sadece

PMNL infiltrasyonunda bulundu (MannWhitney U Testi). Likopen tedavi grubunu kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında; Miyokardiyal ödem ( $p=0.025$ ) Miyositolizis ( $p=0.039$ ) Hemoraji ( $p=0.516$ ) PMNL infiltrasyonu ( $p=0.016$ ). İstatistiksel olarak Hemoraji dışında Miyokardiyal ödem, Miyositolizis ve PMNL infiltrasyonu yönlerinden anlamlı farklılıklar bulundu (MannWhitney U Testi).

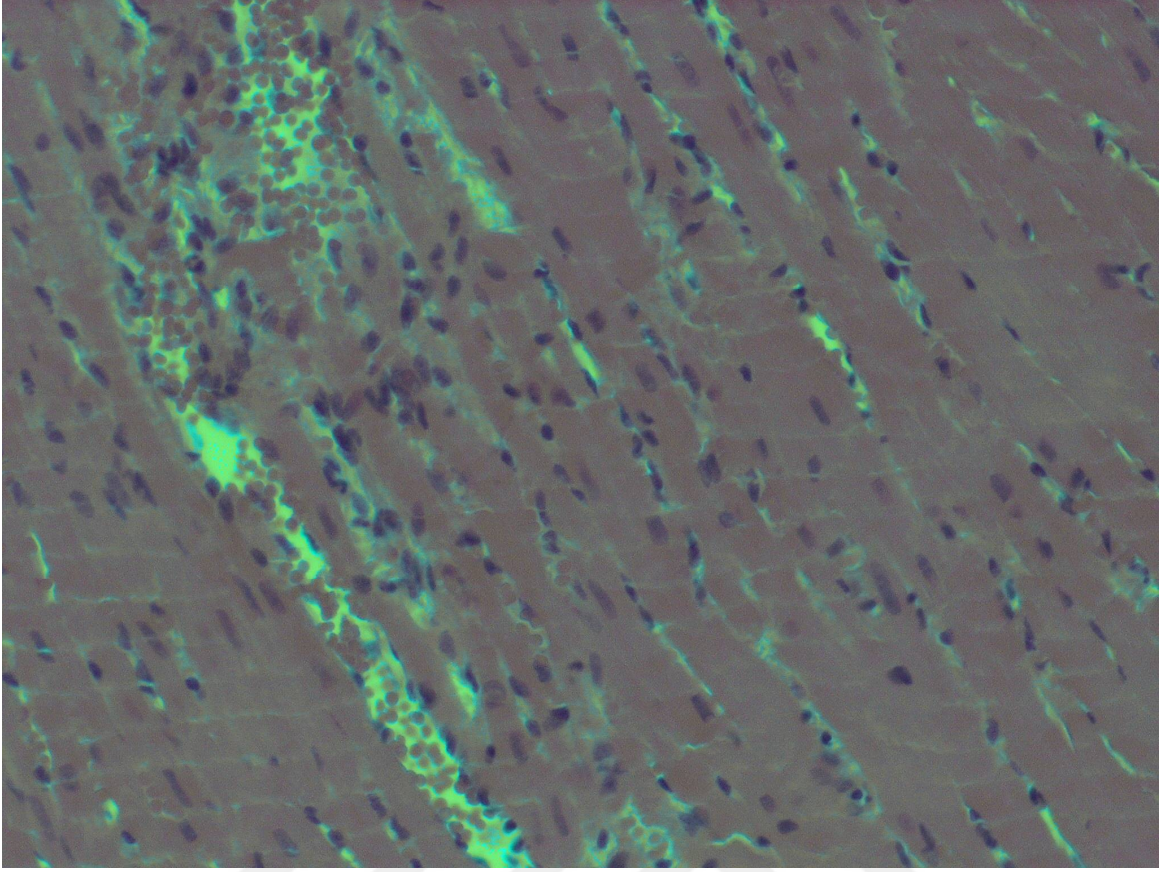


**Resim 3.** Miyokard Hemoraji

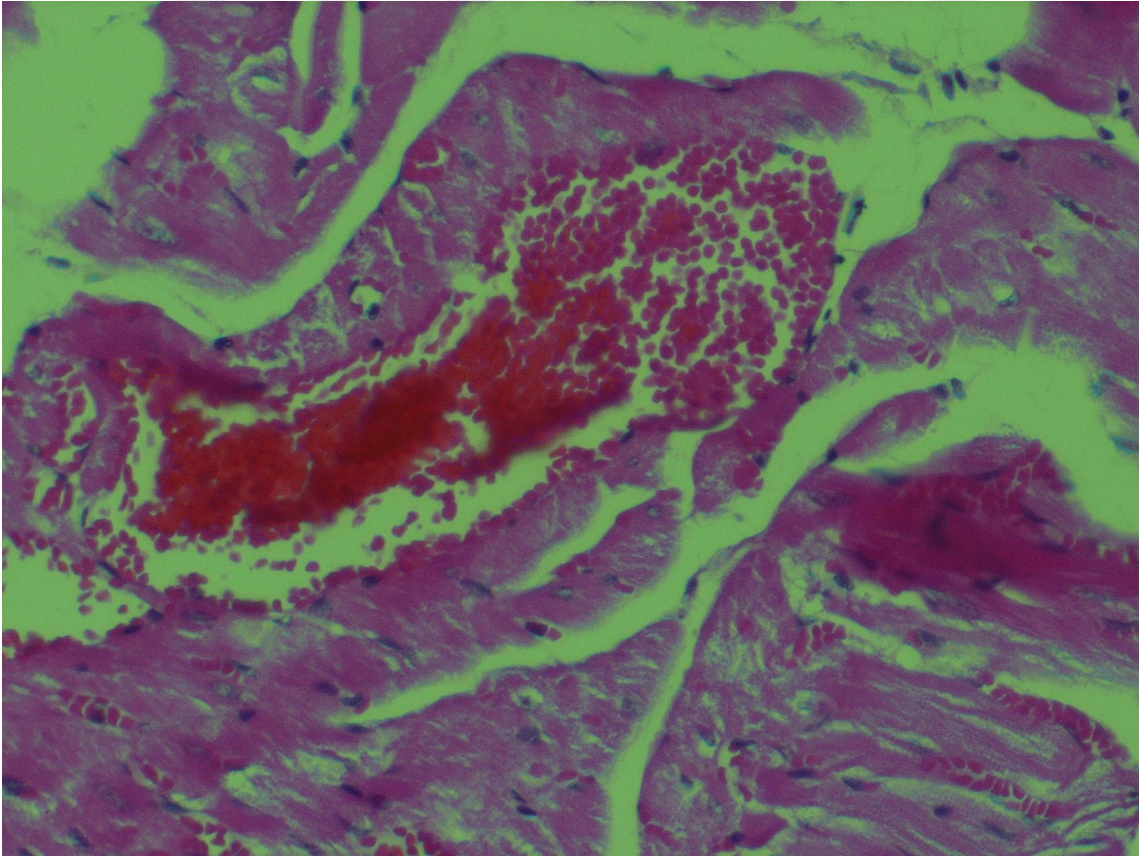


**Resim 4.** Miyokard Ödem





**Resim 5.** Miyositolizis



**Resim 6.** PMNL infiltrasyonu

## 5- TARTIŞMA

Çalışmamızda, ratlarda oluşturulan deneysel kalp İR modelinde likopenin koruyucu rolü araştırıldı.

İR hasarı birçok faktörün rol aldığı kompleks bir patofizyolojiye sahiptir. İskeminin yol açtığı doku hasarı, reperfüzyon sırasında hücre içinde birçok biyokimyasal yolda üretilen reaktif oksijen türleri aracılığı ile hücre ölümüne yol açabilir. Ayrıca proinflamatuvar mediyatörlerin oluşumu ve nötrofil, makrofaj ve lenfositlerin bölgeye toplanması, hasarın genişlemesini sağlar ve İR hasarının sistemik etkilerinden sorumludur. Tüm bu mekanizmalar iskeminin süresi ve şiddetine göre dokular arasında da farklılıklar gösterir. Bu nedenle İR hasarında oksidatif/nitrozatif stresin biyokimyasal mekanizmalarının anlaşılması doku ve organlara yönelik yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi açısından klinikte önemli bir role sahiptir.

Kalp hastalıkları, ölüm nedenleri içerisinde ilk sırada yer almakta ve ani ölümlerin çoğundan kalp İR aritmileri sorumlu tutulmaktadır (140). Bu aritmilerin nedeni hala spekülatif olmakla beraber, iskemideki elektrofizyolojik anormallikler (özellikle,  $Ca^{+2}$  ve  $K^{+}$  için iyonik dengesizlik) ve reperfüzyonda aşırı serbest radikal üretimi, geçerli hipotezler olarak kabul edilmektedir. Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, apoptoz ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü meydana getirmektedir.

Likopen, singlet oksijen ile serbest radikallerin etkilerini önlemede yüksek derecede antioksidan etkisi yönünden birçok çalışmada etkileri araştırılmıştır. Likopen tarafından güçlü bir şekilde oluşturulan antioksidan aktivite; çeşitli oksidatif hasarların, toksisite ve diğer hastalıkların önlenmesine aracılık eder. Bundan dolayı karotenoidler arasında likopen, biyolojik etkilere karşı daha etkili bir antioksidandır ve hem in vivo hem de in vitro doku ve hücrelerin iyileşmesi ya da korunmasına katkıda bulunur (141). Likopenin kanser, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz ve diyabet gibi kronik hastalıkların tedavisinde antioksidan etkilerinin olabileceğini belirtilmiştir (142).

Likopenin serbest radikalleri yakalayan bir antioksidan olarak hareket etmesinden dolayı, inflamatuvar etkisi güçlüdür ve hücrel hasarı azaltır (143). Ayrıca hidroksil radikallerini nötralize ederek lipid peroksidasyondan korumada önemlidir. Ek olarak GR, Gpx ve SOD gibi antioksidan enzimleri uyarabilir (144). Lipid peroksidasyonu ve lipoprotein modifikasyonunu indükleyen hidrojen peroksidi inhibe edebilir (145).

İnsanda likopenin ana kaynağı adipoz dokudur ve karotenoidlerin yarısından fazlası bu kısımdadır. Adipoz dokuda likopen sadece lipid damlaları şeklinde depo edilmez aynı zamanda hücre membranında da saptanabilir. Membranlardaki likopen varlığı adipositlerin fizyolojisini etkileyebilir. Likopen ve metabolitlerinin adipoz doku inflamatuvar durumunu etkileyebileceği rapor edilmiştir. Gerçekten de adipoz doku inflamasyonu içeren bazı gen ekspresyonlarını azaltabileceği gösterilmiştir. Bu sonuçlar likopenin antiinflamatuvar etkilerinin mekanizmasını açıklar. Adipoz doku inflamatuvar sitokinler, akut faz proteinleri gibi inflamatuvar belirteçlerin artmasında merkezi bir rol oynar. Ayrıca adipoz doku makrofaj, T hücreleri ve dentritik hücreleri içeren immün sistemin diğer inflamatuvar efektörleriyle etkileşimde de anahtar görevinde bulunur (146).

Daha önceden çok iyi tanımlanan antioksidan (141-145) ve antiinflamatuvar (146) etkilerinden dolayı, temelde oksidatif/nitrozatif stres kaynaklı olan ve inflamatuvar olayların eşlik ettiği kalp İR hasarında, likopenin'nin etkinliğini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Normal fizyolojik koşullarda oluşan süperoksit radikali, SOD ile önce hidrojen peroksite sonra da CAT etkisi ile suya dönüşür. Ancak İR'da ksantin oksidaz etkisine bağlı olarak artan süperoksit radikali ve hidrojen peroksit, antioksidan kapasiteyi aşar ve ortamdaki etkin bir şekilde temizlenemez. Bizim çalışmamızda, İR grubunda tedavi grubuna kıyasla SOD aktivitesinde belirgin bir azalmanın olması; İR hasarına bağlı olarak hücre içinde süperoksit anyon radikallerini arttığı ve SOD enzim aktivitesinin azalmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Buna ek olarak, çalışmamızda İR hasarına karşı likopen tedavisi verilen grupta SOD enzim aktivitesinin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Üstelik, çalışmamızda kalp İR grubunda CAT aktivitesinde, tedavi grubuna göre önemli düşüş görülürken, likopen tedavisi ile CAT aktivitesinde artış gözlenmiştir. Kalp İR grubunda hücre içerisinde yüksek oranda üretilen peroksit CAT'ın aktivitesini azalttığı, tedavi grubunda likopen tedavisinin koruyucu etkisi ile CAT aktivitesinin arttığı düşünülmektedir. Dolayısıyla in vivo ortamda SOD ve CAT'ın kombine etkisi göze çarpmaktadır. Bunun nedeni; likopen'in, peroksiti metabolize eden CAT enzimini aktive ederek, süperoksit anyon radikalini peroksit'e katalize eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif/nitrozatif stres esnasında CAT aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu NOS enzimini inhibe ederek etki gösterdiği düşünülmektedir. Likopen ile yapılan bazı çalışmalarda likopenin serbest oksijen radikallerini tutucu özelliği hücre zarı lipidlerin peroksidasyonunu önleyerek peroksidasyon sonucu oluşan MDA

düzeyini düşürdüğü, SOD, GPx gibi endojen antioksidanların aktivitelerini artırdığı gösterilmiştir (147-151).

MDA, poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan stabil bir son üründür. Doku İR hasarında, ksantin oksidaz enzimi, mitokondriyal oksidasyon, siklooksijenaz aracılı doymamış yağ asidi oksidasyonu, katekolamin oksidasyonu, sitokrom p 450 aracılı oksidasyon, lökosit NADPH oksidaz aktivasyonu, demir salınımı ve redoks siklusu lokal ve sistemik serbest oksijen radikal oluşumuna katkıda bulunur (152,153). Artmış serbest oksijen radikalleri (özellikle hidroksil radikali), hücre zarı fosfolipidlerinin (araşidonik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri) peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı bütünlüğünde bozulma, hücre şişmesi ve arşidonik asit/lipidperoksil salınımına neden olur. Bu süreçte, zincirleme bir serbest oksijen ve yağ asidi radikali oluşumu ile ilerleyici hücre zarı hasarı gerçekleşir (152,153). Dolayısıyla, bu kısır döngü sırasında meydana gelen ve stabil bir molekül olan MDA düzeyi ölçümü ile reaktif oksijen türevleri ve membran hasarı derecesi hakkında fikir sahibi olunabilir (154). Yapılan çalışmalarda biyokimyasal veriler, kan MDA düzeylerinin İR ile belirgin ölçüde arttığını göstermiştir (155). Biyokimyasal parametrelerin değerlendirildiği çalışmalarda rosuvastatinin direkt etkisi ile MDA (155). düzeylerini düşürdüğü belirtilmektedir. Antioksidan özelliğinden dolayı rosuvastatinin değişik doku ve organlarda oluşan İR hasarı ve birçok oksidatif stres kaynaklı hasarı önlemede antioksidan enzim düzeylerini arttırmak suretiyle etkili olabileceği bildirilmiştir. Kapan ve ark.(2009), aortik İR grubunda, kontrol grubuna göre MDA düzeyinde anlamlı artış saptanırken, aortik İR+eritropoietin grubunda ise MDA düzeyinde anlamlı azalma saptanmadığını bildirmişlerdir (156). Deneysel olarak, alt ekstremitte İR(157). ve aortik oklüzyon-reperfüzyon(158) sonrasında akciğer MDA doku düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Patel ve ark.(159). ile Ateş ve ark.(160). eritropoietinin ratlarda böbrek İR hasarına etkisini araştırmışlar ve eritropoietin uygulanan grupta lipid peroksidasyonunda anlamlı azalma saptamışlardır. Bununla birlikte, Özakoyol ve ark.(161). ratlarda karaciğer İR hasarına L-nitro-argininmetil-ester'in etkisini araştırmışlar, L-nitro-argininmetil-ester verilen grupta İR hasarının histopatolojik olarak anlamlı derecede azaldığını; ancak, karaciğer MDA doku düzeylerinin anlamlı derecede azalmadığını bildirmişlerdir. Bu sonucu, verilen ilacın oluşan İR hasarını lipid peroksidasyonundan bağımsız olarak azaltabileceği yorumu ile açıklamışlardır.

Hem iskemi hem de reperfüzyonu takiben zarar gören endoteliumda NO sentezi belirgin derecede azalır. NO gibi inhibitör etkisi çok kuvvetli bir ajanın eksikliği nötrofil

aktivasyonunun kolaylaşmasına ve doku hasarının artmasına yol açabilir. Reperfüzyondan önce NO ve NO donörlerinin uygulanması ile infarkt alanı ve endotelial fonksiyon kaybı gibi İR'un neden olduğu miyokardiyal hasar azaltılabilir (162). Reperfüzyonun geç fazında üretilen NO ve peroksinitrit (ONOO-)'in reperfüzyonun erken fazına oranla çok daha fazla olduğu ve bu durumun uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) "up"-regülasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (163). NO düzeyindeki bu gecikmiş artış, doku hasarının daha da artmasına neden olur (163). Aynı zamanda iNOS blökörü aminoguanidinin hem kardiyak (164). hem de renal (165). İR hasarında yararlı etkileri bildirilmiştir. Yüksek konsantrasyondaki NO'in kardiyak miyosit fonksiyonunu deprese etmesi, İR'u takiben inflamatuvar süreçleri uyarması, mitokondriyal solunumu bozması, nekroza ve apoptozise neden olması gibi birçok zararlı etkisi vardır. Çalışmamızda kalp İR grubunda tedavi grubuna kıyasla NO düzeyinde artış saptanmıştır. NO üretimindeki artışın, İR hasarına bağlı olarak hücre içerisinde inflamatuvar sitokinlerin ve diğer medyatörlerin açığa çıktığı ve immun olarak aktif bir dönemin göstergesi olabilir. NO tek başına değil oksijen varlığında peroksinitrite dönüşerek toksik etkilere aracılık eder. ONOO-, peroksinitroz asit ve hidroksil radikaline dönüşebilmektedir. NO inhibisyonunun ONOO- oluşumunu engelleyeceği ve kardiyak performansı artırabileceği gösterilmiştir (166,167).

İR, inflamasyon gibi birçok patolojik olayda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artarak NO ve süperoksitin simultane olarak salıverilmesine yol açar. Makrofajlar ve nötrofiller stimüle edildiklerinde NO ve süperoksiti salıvererek peroksinitrit oluşumuna neden olabildikleri gibi, NO ve süperoksit farklı hücrelerden salıverilip peroksinitrit oluşturabilirler. Peroksinitrit proteinlerdeki veya serbest halde ki tirozinin fenolik halkasına nitro grubu ekleyerek 3-NT oluşturur. Tirozinin geri dönüşümsüz olarak nitrasyonu, tirozinin fosforillenmiş ve fosforillenmemiş formlarının birbirine dönüşümünü engelleyerek, enzim aktivitesinin ve sinyal ileti mekanizmalarının düzenlenmesini etkiler. Nitrotirozin'in, peroksinitrit oksidasyonunun kararlı son ürünü olması nedeniyle NT ölçümünün NO bağımlı in vivo hasarın tespitinde kullanılan bir belirteç olduğu bildirilmektedir (168). Çalışmamızda kalp İR'de 3-NT düzeylerinin artması, İR hasarında peroksinitritin oluştuğunu göstermektedir. Üstelik, NO ve 3-NT düzeylerinin yüksek saptanması reaktif nitrojen türlerinin kalp İR'de inflamatuvar süreçte olası iNOS enziminin indüklenmesiyle oluşup miktarlarının arttığını düşündürmektedir.

Kalp dokusunu kurtarmak için gerekli olan reperfüzyon, içinde myokardiyal apoptoz ve nekrozun olduğu bir seri olayın başlamasına neden olur. Tez çalışmamızda İR grubundaki ratların hepsinde mikroskobik hasar gözlemlendi. Mikroskobik hasarlanma

bulguları olan PNL infiltrasyonu, ödem, hemoraji ve miyositolizis oluşmayan denek yoktu. Bulgularımız İR modelinin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Likopen tedavi grubunda hasar derecesinin İR grubuna kıyasla hafif derecede olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda likopen, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile kalbi İR hasarına karşı koruyabilir. Kafeik Asit Fenetil Ester (KAFE)'nin kalp İR' den kaynaklanan infarkt alanı üzerindeki tedavi edici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (169), 14 erkek rat iki gruba ayrılarak ve kalp İR protokolleri aynen uygulanmıştır. Bir gruba iskemiden 10 dk önce KAFE verilmeye başlanarak ve iskemi boyunca da verilmeye devam edilmiştir. İnfarkt büyüklüğü ve risk zonu planimetrik yöntemlerle belirlenip kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, KAFE (50 µmol/kg) uygulanan grupta miyokardiyal infarkt alanı/risk zonu alanı oranının, istatistiksel anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada, kalp İR tarafından indüklenen miyokardiyal hasarın azaltılmasında KAFE'nin etkinliği gösterilmiştir.

Çalışmamızda likopenin de biyokimyasal ve histopatolojik olarak antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi görüldü. Likopenin antioksidan etkisini; NO, 3-NT ve MDA düzeylerini azaltarak ve SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini de artırarak gerçekleştirdiği, antiinflamatuvar etkisini; olası iNOS'un katalitik aktivitesini inhibe ederek NO ve 3-NT düzeylerini azaltmış olabileceğini düşünülmektedir.

Sonuç olarak likopenin, kalp İR aracılı oksidatif/nitrozatif stresin tetiklediği hasar basamaklarını, nötrofiller, ksantin oksidaz ve lipooksijenaz ile etkileşime girerek koruyabilir/düzeltebilir. Bu çalışmanın sonuçları likopen'in ratlarda kalp İR'ye bağlı hasarı azalttığını göstermektedir. Likopen'in kalp İR hasarında klinik uygulanabilirliğini test etmek için mikro ve makro düzeyde daha detaylı ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmamızda kalp İR oluşturulan ratlarda gelişen kalp doku hasarında likopen'in koruyucu rolünü araştırdık. Çalışmamızda 220-300 gr arasında değişen Wistar Albino tipi erkek ratlar kullanıldı. Deney hayvanı olarak ratların seçilmesinin nedeni; KSÜ Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarında yetiştiriliyor olması ve İR modellerinde sık kullanılıyor olmasından dolayıdır. Bu amaçla, biyokimyasal parametre olarak MDA, NO, 3-NT, CAT ve SOD (doku) düzeylerini ölçüp, kalp doku kesitlerinden histopatolojik değerlendirme yaptık. Sonuç olarak;

### 1-Katalaz ile ilgili sonuçlar

Tedavi grubunda CAT aktivitesi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede yüksek iken ( $p<0,05$ ), kontrol ve sham gruplarında anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Ancak, sham ve kontrol grupları arasında CAT aktivitesi yönünden anlamlı farklılıklar gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

### 2- Superoksit Dismutaz ile ilgili sonuçlar

Tedavi grubunda SOD aktivitesi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede yüksek iken ( $p<0,05$ ), kontrol ve sham gruplarında anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Ancak, sham ve kontrol grupları arasında CAT aktivitesi yönünden anlamlı farklılıklar gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

### 3-Malondialdehit ile ilgili sonuçlar

Tedavi grubunda MDA düzeyi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede düşük iken ( $p<0,05$ ), kontrol ve sham gruplarında anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Üstelik, sham ve kontrol grupları karşılaştırıldığında kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek MDA düzeyi saptandı ( $p<0,05$ ).

### 4- Nitrik Oksit ile ilgili sonuçlar

Tedavi grubunda NO düzeyi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede düşük iken ( $p<0,05$ ), kontrol ve sham gruplarında anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Ancak, sham ve kontrol grupları arasında NO düzeyi yönünden anlamlı farklılıklar gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

### 4- Nitrotirozin ile ilgili sonuçlar

Tedavi grubunda 3-NT düzeyi kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında tedavi grubunda anlamlı derecede düşük iken ( $p<0,05$ ), kontrol ve sham gruplarında anlamlı

derecede yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). Ancak, sham ve kontrol grupları arasında 3-NT düzeyi yönünden anlamlı farklılıklar gözlenmedi ( $p>0,05$ ).

5- Kontrol, Sham ve grublarında istatistiksel olarak Hemoraji dışında Miyokardiyal ödem, Miyositolizis ve PMNL infiltrasyonu yönlerinden anlamlı farklılıklar bulundu ( $p<0,05$ ).

Sonuç olarak, likopen tedavi grubunda antioksidan aktivitenin yüksek, oksidatif/nitrozatif stres düzeylerinin düşük olduğu bulundu. Buna ek olarak Polimorf Nüveli Lökositlerin infiltrasyon derecesinin de daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum Likopenin kalp iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine antioksidan olma özelliğine bağlı olarak koruyucu etkisi olabileceğini düşündürmektedir.





## 7. KAYNAKLAR

1. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Sıklığı Çalışması 2013. Ankara.
2. Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K et al. A comparison at coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003. 349:733-742
3. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim* 2009;Cilt:22/No:3:5-13. 2
4. Braunwald E. Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival. should the paradigm be expanded? *Circulation* 1989;79:441-444
5. Cobbe Sm, Poole-Wilson Pa. The time of onset and severity of acidosis in myocardial ischaemia. *J Mol Cell Cardiol* 1980;12:745-760
6. Garlick Pb, Radda Gk, Seeley Pj. Studies of acidosis in the ischaemic heart by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Biochem J* 1979; 15;184:547-554
7. Leaf A. Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume. *Ann N Y Acad Sci* 1959; 6;72:396-404
8. Harper IS, Lochner A. Sarcolemmal integrity during ischaemia and reperfusion of the isolated rat heart. *Basic Res Cardiol* 1989;84:208-226.
9. Moulder PV, Blackstone EH, Eckner FA, Lev M. Pressure-derivative loop for left ventricular resuscitation. *Arch Surg* 1968;96:323-327.
10. Gott VI, Dutton RC, Young WP. Myocardial rigor mortis as an indicator of cardiac metabolic function. *Surg Forum* 1962;13:172-174.
11. Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* 1987;60:153-168
12. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 1973;5:395-407.
13. Weissler AM, Kruger FA, Baba N, Scarpelli DG, Leighton RF, Gallimore JK. Role of anaerobic metabolism in the preservation of functional capacity and structure of anoxic myocardium. *J Clin Invest* 1968;47:403-16.

14. Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera CM. Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 1980;12:797–808.
15. Shlafer M, Kane PF, Kirsh MM. Superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic, reperfused heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;83:830–9.
16. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:1404–7.
17. Arroyo CM, Kramer JH, Dickens BF, Weglicki WB. Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Letters* 1987;221:101–4.
18. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest* 1988;82:476–85.
19. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther* 2012;133:230– 55.
20. Boersma E, Maas AC, Deckers JW. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet* 1996;348:771-75
21. Teagtmeyer H, King LM, Jones BE. Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets of pharmacotherapy. *Am J Cardiol* 1998;82:54-60.
22. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implication of stunning, hibernation, and precondition: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998;97(18):1848-1867.
23. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001;104(24):2981-89.
24. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning and their clinical implications: part 2. *Circulation*. 2001;104(25):3158-67.
25. Ohmori M, Kobayashi E, Harada k, Kitoh Y. Do immunosuppressants affect neutrophils, resulting in protection of the liver against ischemia-reperfusion injury? *Transplantation* 1998;66:940-941.

26. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res.* 1990;66(4):913-931.
27. Lemasters JJ.V. Necrapopyosis and mitochondrial permeability transition: Shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol.* 1999 Jan;276(1 Pt 1):G1-6.
28. Downey JM, Cohen MV, Mitochondrial K channel opening during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic rat hearts. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2001;33:651-3.
29. Yellon DM, Dana A, The preconditioning phenomenon: Atol for the scientist or a clinical reality? *Circ Res.* 2000;87:543-50.
30. Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell.* 2003 Feb 21; 112(4): 481–90.
31. Aydemir B, Karadağ Sarı E. Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veterinary Journal.* 2009; 2(2): 56-60.
32. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* 2007; 357: 1121-35.
33. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 1973; 5: 395-407.
34. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 181-90.
35. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; 91: 1872-1885.
36. Simpson PJ, Mitsos S, Ventura A, et al. Prostacyclin protects ischemic-reperfused myocardium in the dog by inhibition of neutrophil activation. *J Am Heart* 1987; 113: 129-137.
37. Teagtmeyer H, King LM, Jones BE. Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets of pharmacotherapy. *Am J Cardiol* 1998;82:54-60.
38. Boersma E, Maas AC, Deckers JW. Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet* 1996;348:771-75.
39. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implication of stunning, hibernation, and precondition: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998;97(18):1848-1867.

40. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001;104(24):2981-89.
41. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning and their clinical implications: part 2. *Circulation*. 2001;104(25):3158-67.
42. Ohmori M, Kobayashi E, Harada k, Kitoh Y. Do immunosuppresants affect neutrophils, resulting in protection of the liver against ischemia-reperfusion injury? *Transplantation* 1998;66:940-941.
43. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. İschemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res*. 1990;66(4):913-931.
44. Lemasters JJ.V. Necrapopyosis and mitochondrial permaebility transition:Shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol*. 1999 Jan;276(1 Pt 1):G1-6.
45. Akkoc H. Miyokardiyal İskemi Reperfuzyon Hasarı. *Dicle Tıp Dergisi* 2008; 35:211-215.37.
46. Kılinc K, Kılinc A. Oksijen toksisitesinin aracı molekulleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002;33:110-118.
47. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The Am J Off Surgery* 1991;161:488-503.
48. Acworth IN, Bailey B. Reactive oxygen species. In: Acworth IN, Bailey B, *The handbook of oxidative metabolism*, Chelmsford (MA): ESA Inc,1995,1–4.
49. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, et al. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995;3:348-354.
50. Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Tan DX, et al. Free radicalmediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001;939:200-215.
51. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 2000;39:1529-1542.
52. Ertan T, Soran A, Kılıc M, ve ark. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) onemi. *Cerrahi Tıp Bulteni* 2001;2;4:154-167.

53. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000;9:647-652.
54. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000, 21;3:361-370.
55. Unno N, Fink MP. Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology Clinics* 1998;27;2:289-307.
56. Thornaley, P.J. And Vasak M., Possible Role of Metallothionein in Protection against Radiation-Induced Oxidative Stress: Kinetics and Mechanism of Its Reaction with Superoxide and Hydroxyl Radicals, *Biochem. Biophys. Acta.* 1985, 827, 35–44.
57. Cheeseman, K.H. And Slater, T.F.,. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993, Jul; 49(3), 481-93.
58. Weiss, S.J. And Lobuglio, A.F.,. Phagocyte-Generated Oxygen Metabolites and Cellular Injury. *Lab. Invest.* 1982, 47, 5–18.
59. Freeman, B.A. And Crapo, J.D.,. Free Radicals and Tissue Injury. *Lab. Invest.* 1982, 47, 412-426.
60. Halliwell, B.,. Oxygen Radicals; A Commonsense Look at Their Nature and Medical Importance. *Med. Biol.* 1984, 62, 71-77.
61. Kavas, G.Ö.,. Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri* 1989, 9, 1-8.
62. Nordberg, J. And Arnér, E.S.J.,. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biol. Med.* 2001, 31, 1287– 1312.
63. Netto, L.E.S., Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. And Vercesi, A.E.,. Thiol Enzymes Protecting Mitochondria against Oxidative Damage. *Methods Enzymol.* 2002, 348, 260-270.
64. Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. And Symons, M.C.R.,. Techniques in Free Radicals Research. Elsevier, Amsterdam, 1991, vol 22. (14p) pp.1-278.
65. Brantley, R.E.,. The Mechanism of Autoxidation of Myoglobin. *J. Biol. Chem.,* 1993, 268, 6995–7010.
66. Akkus, I., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimosza Yayınları, 38, Kuzucular Ofset, 1995, Konya-Türkiye.

67. Domigan, N.M., Charlton, T.S., Duncan, M.W., Winterbourn, C.C. And Kettle, A.J.,. Chlorination of Tyrosyl Residues in Peptides by Myeloperoxidase and Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, pp. 16542– 16548.
68. Shacter, E., Protein Oxidative Damage. *Methods Enzymol.* 2000, 319, 428-436.
69. Erenel, G., Erbaş, D. Ve Arıcıoğlu, A., Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistemler. *Gazi Tıp Derg.* 1992, 3, 243-250.
70. Seven A., Candan G., “Antioksidan savunma sistemleri.” *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, (1996): 27(1), 41-50.
71. Moncado S, Higgs A. The L- arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329:2002 -2012.
72. Contestabile A. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 32: 476- 509.
73. Halliwell B. Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3th Ed. Oxford University Press, New York 1999; 73-123.
74. Koşay S. Nitrik Oksid'in Patolojik Olaylardaki Rolü. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Basımevi, Bornova-İzmir* 1996; 83: 1-83.
75. Klotz T, Bloch W, Volberg C, Enge Imann U, Addicks K. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 1897 -1903.
76. Becker Em., Nissen Ls., Skibsted LH., “Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects.” *European Food Research and Techonology*, (2004): 10.107/s00217-004-1012-4.
77. Rice-Evans C., “Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity.” Chapter 16, p.239-253, In: *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, Ed: Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T., Elsevier Inc. (1999).
78. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia–reperfusion. *Cardiovasc. Res.*; (1996) 32 (4):743– 751.
79. Candan G., “Antioksidan savunma sistemleri.” *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, (1996): 27(1), 41-50.
80. Şener G, Yeğen Berrak Ç. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi.* 2009; 22: 5-13.

81. Dündar Y, Aslan R. Hücre Moleküler Statüsünün Anlaşılması ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller, Antioksidanlar. İnsizyon Cerrahi Tıp Bilim Dergisi. 1999; 2(2): 134-142.
82. Temur N., Çam, Kavak, Söğüt ve Armut Ağaçlarının Üzerinde Yetişen Ökse Otu Bitkilerinin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006, 18, 19,20.
83. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. Can J Cardiol 1993; 9: 89-93.
84. M.F.C.M Knapen, Zusterzeel P.L.M, Peters W.H.M, Steegers E.A.P. Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 1999;82: 171-184.
85. Çaylak, E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. Tıp Araştırmaları Dergisi, 2011, 9: 73-83.
86. Padayatty, S.J., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, P.K., Song, J., Koh, W.S., Levine, M. Vitamin C: From molecular actions to optimum intake. Handbook of Antioxidants, 2001, pp. 117-145, New York.
87. Karademir, S. E., Bazı Polifenolik Bileşiklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tayini, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005, 5-21.
88. Freeman B.A., Crapo J.D.: Biology of disease, free radicals and tissue injury. Lab Inv 1982; 47(5):412.
89. Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. Endocrine 2005; 27:101-110.
90. Sewerynek E. Melatonin and the cardiovascular system. Neuro Endocrinol Lett 2002; 23(1):79-83.
91. Paulis L, Simko F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. Physiol Res 2007; 56:671-684.
92. Şener G, Balkan J, Cevikbaş U, Keyer-Uysal M, Uysal M. Melatonin reduces cholesterol accumulation and prooxidant state induced by high cholesterol diet in the plasma, the liver and probably in the aorta of C57BL/6J mice. J Pineal Res 2004; 36:212-216.
93. González-Pérez O, Moy-López NA, Guzmán-Muñiz J. [Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine] Rev Invest Clin. 2008; 60: 58-67.

94. Gott VI, Dutton RC, Young WP. Myocardial rigor mortis as an indicator of cardiac metabolic function. *Surg Forum* 1962;13:172-174.
95. Shen W, Xu X, Ochoa M, Zhao G, Wolin MS, Hintze TH. Role of nitric oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs. *Circ Res* 1994; 75: 1086 - 1095.
96. Oddis CV, Finkel MS. Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits mitochondrial activity in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213:1002 -1009.
97. Muruganandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets, *Biochim Biophys Acta* 1994; 1200:1-6.
98. Demirtaş Ş, Tatlıcıoğlu T. Kronik obstrüktif akciğer hastalığında steroid direnci (histon asetilasyonu ve histon deasetilasyonu). *Solunum* 2007; 9(2): 117- 22.
99. Ignarro, L. J., Buga, G. M.wood, K. S., Byrns, R. E. and Chandhuri, G., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 9265- 9269.
100. Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. and Moncada, S., Vascular endothelium cell synthesise nitric oxide from L-Arginine. *Nature*, 1988, 333, 664-666.
101. Sneddon, J.W. and Vane, J.R., Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelium cells. *Ibid*, 1988, 85, 1341-1344.
102. Ak, Curcumin'in Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006, Erzurum, 1-16.
103. Uğuzlar, H., Antalya'da yetişen Araceae arum'un antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde tayini, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009, 1-28, 45-49, 70-73.
104. Pagliai C.H., Kotecha S., Shuker D.E.G., Analytical methods for 3- nitrotyrosine as a Marker of Exposure to Reactive Nitrogen Species: A Review, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1998, Vol. 2, No. 5, 324–336.
105. Duncan M.W., A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine, *Amino Acids*, 2003, 25, 351- 361.
106. Büyükaşar K. Nitrik oksidin fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardaki rolü, Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı Seminer Özetleri, Mersin 27 Mayıs 2005; ss 2-19.
107. Yaman H, Ünlü A, Karabıçak U ve ark. Measurement of 3-nitrotyrosine by high performance liquid chromatography. *T Klin J Med Res* 2000; 18: 26-30.



108. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000; 109: 315-23.
109. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovascular Research* 2003; 58: 10-9.
110. Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik oksit ve akciğerler. *Toraks Dergisi* 2003; 4(1): 88-94.
111. Stahl W, Sies H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans, *Arch Biochem Biophys*, (1996) 336(1), 1-9.
112. Rousseau EJ, Davison AJ, Dunn B. Review: Protection by beta-carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis, *Free Radic Biol Med* (1992); 13, 4, 407-433.
113. Boileau TW, Clinton SK, Zarripheh S, Monaco MH, Donovan SM, Erdman JW, Jr.: Testosterone and food restriction modulate hepatic lycopene isomer concentration in male F344 rats, *J Nutr* (2001); 131, 6, 1746-1752.
114. Machima R, Witting PK, Stocker R. Oxidants and antioxidants in atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol* (2001); 12, 4, 411-418.
115. Handelman GJ. The evolving role of carotenoids in biochemistry, *Nutrition* ( 2001); 17, 10, 818-822.
116. Stahl W, Sies H. Review. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans, *Arch Biochem Biophys* (1996); 336(1), 1-9.
117. Kozuki Y, Miura Y, Yagasaki K .Inhibitory effect of carotenoids on the invasion of rat ascites hepatoma cells in culture, *Cancer Lett* (2000); 3, 151(1) , 111-115.
118. Kucuk O, Sarkar FH, Djuric Z, Sakr W, Pollak MN, Khachik F, Banerjee M, Bertram JS, Wood DP. Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer, *Exp Biol Med (Maywood)* (2002); 227,10, 8815-8828.
119. Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *BBA molecular Basis of disease* (2005); 1740, 2, 101-107.
120. Bramley PM Review. Is lycopene beneficial to human health. *Phytochemistry* (2000); 54, 3, 233-236.
121. Khachik F, Carvlho L, Bernstein PS, Muir GJ, Zhao DY, Katz NB. Chemistry, distribution and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health, *Exp Biol Med (maywood)* (2002); 227, 10, 845-851.
122. Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: review of the epidemiologic literature, *J Natl Cancer Inst.* (1999); 17, 91(4), 317-331.

123. Dorgan JF, Sowell A, Swanson CA, Potishman N, Miller R, Schussler N, Stephenson HE. Jr. Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzyme in the rat, *Cancer Lett* 30 (2000); 154(2). 201-210.
124. Erhardt JG, Meisner C, Bode JC. Lycopene, beta-carotene and colorectal adenoms, *Am J Clin Nutr* (2003); 78. 6, 1219-1224.
125. Parker RS. Absorption, metabolism and transport of carotenoids, *FASEB J* (1996); 10, 542-551.
126. Pellegrini N, Riso P, Porrini M. Tomato consumption does not affect the total antioxidant capacity of plasma, *Nutrition* (2000); 16, 4, 268-271.
127. Ames BN, Gold LS, Willet WC. Causes and prevention of cancer, *Proc Natl Sc. USA* (1995); 92, 5258-5265.
128. Witztum JL. The oxidation hypothesis of antherosclerosis, *The Lancet* (1994); 344; 793795.
129. Harats D, Chevion S, Nahir M, Norman Y, Sagee O, Berry E. Citrus fruit supplementation reduced lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamin C and E in vivo, *Am J Clin Nutr* (1998); 67: 240-245.
130. Conn PF, Schach W, Truscott TG. The singlet oxigene and carotenoid interaction, *Photobiol.* (1991); B11, 41-47.
131. Matos HR, Capelozzi VL, Gomes OF, Mascio PD, Medeiros MH. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate, *Arch Biochem Biophys* (2001); 396, 171-177.
132. Porrini M, Riso P. Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato compsuption, *J Nutr* (2000); 130, 189-192.
133. Obermuller-Jevic UC, Olano-Martin E, Corbacho AM, Eiserich JP, Van Der Vliet A, Valacchi G, Cross CE, Packer L. Lycopene inhibits the growth of normal human prostate epithelial cells in vitro, *J Nutr* (2003); 133, 3356-3360.
134. Şahin K, Ozercan R, Onderci M, Sahin N, Gursu MF, Khachik F, Sarkar FH, Munkarah A, Ali-Fehmi R, Kmat D, Kucuk O. Lycopan supplementatiot prevents the development of spontanous smoot muscle tumors of the oviduct in Japanese guail, *Nutr Cancer* (2004); 50: 181-189.

135. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
136. Cortas NK, Wakid NW. Determination inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *ClinChem* 1990; 36: 1440-1443.
137. Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95: 351–358.
138. Fridovich I. Superoxide dismutase. *Adv Enzymol* 1974;41:35–97.
139. Beutler E . *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods* . 2nd ed. New York : Grune and Stratton Inc ; 1984 : 68 – 70.
140. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemicreperfused heart. *Cardiovascular Research* 2003; 58: 10-9.
141. Ellen O, Michael H, Boris A, Catherine MacGillivray, et al. Rosuvastatin reduces experimental left ventricular infarct size after ischemia-reperfusion injury but not total coronary occlusion. *AJP - Heart* 2005;288(4):1802-1809.
142. Karahan İ, Yılmaz S, Ateşşahin A. Ratlarda cisplatin ve gentamisin kan ile karaciğerde oluşturdukları oksidatif stres üzerine likopenin etkisi, *FÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*, (2006); 20, 1, 39-43.
143. Pennathur S, Maitra D, Byun J, Sliskovic I, Abdulhamid İ, Saed GM, Diamond MP, Abu-Soud HM. Potent oxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging, *Free Radical Bio Med*, (2010); 49, 205-213.
144. Zhao YP, YU WL, Hu WL, Yung Y. Anti-inflammatory and anticoagulant activities of lycopene in mice, *Nutr. Res*, (2003); 23, 1591-1595.
145. Subbasj K, Bose C, Ağrawal BK. Effect of short term supplementation of tomatoes on antioxidant enzymes and lipid peroxidation type-II diabetes, *Indian J Clin Biochem*, (2007); 22, 95-98.
146. Yılmaz İ. Karotenoidler, *İst Üniv Tıp Fak Derg*, (2010); 17, 3, 223-231.
147. Cadenas, E., Packer, L. *Handbook of antioksidants*, Marcel Dekker. Inc., New York. 1996.
148. Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G. The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001; 385 (1), 13-19.
149. Breinholt, V., Lauridsen, S.T., Daneshvar, B., Jakobsen, J. Dose-Response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat, *Cancer Letters*, 2000; 154, 201-210.

150. Jain, C.K., Agarwal, S., Rao, A.V. The effect of dietary lycopene on bioavailability, tissue distribution, in vivo antioxidant properties and colonic preneoplasia in rats, *Nutrition Research*, 1999; 19(9), 1383-1391.
151. Rao, A.V., Agarwal, S. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer, *Nutrition and Cancer*, 1998; 31(3), 199-203.
152. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004;24:468-75.
153. Cell Injury, Cell Death and Adaptations. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2007: 1-29.
154. Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des*. 2004;10: 2401-10.
155. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986,74:1124-1136.
156. Kapan Ş, Kiriş İ, Kılbaş A, Altuntaş İ, Karahan N, Okutan H. The effect of erythropoietin on lung injury in rat aortic ischemia-reperfusion. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;17(2):110-116
157. Köksal C, Bozkurt AK, Ustündag N, Konukoğlu D, Musellim B, Şirin G, et al. Attenuation of acute lung injury following lower limb ischemia/reperfusion: the pharmacological approach. *J Cardiovasc Surg* 2006;47:445-9.
158. Okutan H, Savaş C, Özgüner İF, Yönden Z, Eren VC, Delibaş N. Lung injury after aortic occlusion-reperfusion in rats: the role of gadolinium chloride. *Tohoku J Exp Med* 2004;203:267-73.
159. Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, et al. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int* 2004;66:983-9.
160. Ateş E, Yalçın AU, Yılmaz S, Köken T, Tokyol C. Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury. *ANZ J Surg* 2005;75:1100-5.
161. Özakıyol AH, Tunçel N, Sarıçam T, Uzuner K, Ak D, Gürer F. Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury. *Pathophysiology* 2000;7:183-8.
162. Johnson GI, Tsao PC, Lefer AM. Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion. *Crit Care Med* 1991; 19: 244-52.

163. Sumeray MS, Rees DD, Yellon DM. Infarct size and nitric oxide synthase in murine myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 35-42.
164. Parlakpınar H, Ozer MK, Sahna E, Acet A. Attenuation of ischemiareperfusion-induced myocardial infarct size in rats by aminoguanidine. 6th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, June, 24-28, 2003, Istanbul/TURKEY.
165. Sahna E, Parlakpınar H, Cihan O.F, Türköz Y, Acet A. Effects of aminoguanidine against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Cell Biochem Funct* 2006; 24: 137-41.
166. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 1-10.
167. Schulz R, Wambolt R. Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 432-9.
168. Kayalı R, Çakatay U. Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 83-9.
169. Ozer MK, Parlakpınar H, Acet A. Reduction of ischemia-reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Clin Biochem* 2004; 37(8): 702-5.

## 8. ŞEKİLLER DİZİNİ

## Sayfa No

Şekil 1. Miyokardiyal iskemi sonrası reperfüzyona bağlı olarak gelişen kardiyak hasara aracılık eden major hücrenel mekanizmalar .....	9
Şekil 2. L-arjinin aminoasidinden NOS enzimi ile NO sentezi .....	14
Şekil 3. İskemide glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın rolü.....	16
Şekil 4. Serbest radikal aracılı oksidatif DNA hasarı.....	20
Şekil 5. PARS' ın aktivasyonu. Poli(adenozin difosfat-riboz [ADP]) sentetaz (PARS),....	21
Şekil 6. 3-Nitrotirozinin açık yapısı .....	23
Şekil 7. ONOOH ve p-Metilfenolün ortak reaksiyonu .....	23
Şekil 8. ONOOH ve p-Metilfenolün radikal yol üzerinden reaksiyonu .....	24
Şekil 9. ONOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ve p-Metilfenolün ortak reaksiyonu .....	24
Şekil 10. ONOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ve p-Metilfenolün radikal yol üzerinden reaksiyonu.....	24
Şekil 11. ONOO <sup>-</sup> Aracılı Protein Tirozin Nitrasyon Yolu .....	25
Şekil 12. Likopenin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 13. Likopenin insan sağlığındaki rolü.....	28
Şekil 14. Protein standart eğrisi.....	36
Şekil 15. MDA(Malondialdehit) standart eğrisi grafiği.....	40
Şekil 16. SOD standart eğrisi .....	43

## 9. TABLOLAR DİZİNİ

## Sayfa No

<b>Tablo 1.</b> Bitki ve meyvelerdeki likopen içeriği .....	26
<b>Tablo 2.</b> İnsan dokularındaki likopen seviyeleri.....	27
<b>Tablo 3.</b> Ratların fizyolojik değerleri.....	31
<b>Tablo 4.</b> Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	36
<b>Tablo 5.</b> Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı .....	36
<b>Tablo 6.</b> MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	39
<b>Tablo 7.</b> Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı .....	40
<b>Tablo 8.</b> SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	42
<b>Tablo 9.</b> SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı.....	42
<b>Tablo 10.</b> Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı.....	43
<b>Tablo 11.</b> Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı .....	45
<b>Tablo 12.</b> Tüm Gruplarda Oksidatif/Nitrozatif Biomarkır Sonuçları .....	47
<b>Tablo 13.</b> Grupların histopatolojik derecelendirilmesi.....	50

## 10. GRAFİK DİZİNİ

## Sayfa No

<b>Grafik 1.</b> Gruplar Arası CAT Aktiviteleri.....	48
<b>Grafik 2.</b> Gruplar Arası SOD Aktiviteleri.....	49
<b>Grafik 3.</b> Gruplar Arası MDA Düzeyleri.....	49
<b>Grafik 4.</b> Gruplar Arası NO Düzeyleri.....	50
<b>Grafik 5.</b> Gruplar Arası 3-NT Düzeyleri.....	50





## 11.RESİMLER DİZİNİ

## Sayfa No

<b>Resim 1.</b> Deneysel Kalp İskemi Reperfüzyon İşlemi-1.....	32
<b>Resim 2.</b> Deneysel Kalp İskemi Reperfüzyon İşlemi-2.....	33
<b>Resim 3.</b> Miyokard Hemoraji.....	51
<b>Resim 4.</b> Miyokard Ödem.....	52
<b>Resim 6.</b> PMNL infiltrasyonu .....	53
<b>Resim 5.</b> Miyositolizis .....	53



## 12.EKLER

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Başlığı	Reperfüzyon Modelinde Likopen'in Koruyucu Rolünün Araştırılması	
	Başvuru Tarihi	26.05.2016	
	Protokol No	15	
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Dili	
	Başvuru Formu	Türkçe	
KARAR BİLGİLERİ	Oturum No: 2016/06	Karar No: 01	Tarih: 06.06.2016
	Prof. Dr. Ergül Belge KURUTAŞ 'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleşmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.		

#### K.S.Ü. TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Prof. Dr. Ali ÇETİNKAYA

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Araştırma ile ilişki (*)		Katılım (**)		İmza
Prof. Dr. Ali ÇETİNKAYA Başkan	İç Hastalıkları	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN Üye	Tıbbi Biyokimya	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Doç. Dr. Mehmet BOŞNAK Üye	Fizyoloji	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN Üye	Tıbbi Biyokimya	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İsmail ORHAN Üye	KBB	KSU 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	KSU 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	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Atila YOLDAŞ Üye	Anatomi	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Akif Hakan KURT Üye	Tıbbi Farmakoloji	KSU 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	KSU 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	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Adem DOĞANER Üye	Biyostatistik	KSU Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Mehmet Emin DARENDELI Üye	Avukat	Serbest	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Mustafa CANSARAN Üye	Mühendis	Tarım İl Müdürlüğü	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
SERH (VARSA)							

\*Araştırma ile ilişki  
\*\*Toplantıda Bulunma



Ali Rıza BEKLER  
Fakülte Sekreteri

## ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler**

Adı, soyadı : Özlem BOZKUŞ  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 17/11/1989  
Medeni hali : Evli  
Telefon : 05534509444  
Yabancı dil : İngilizce  
e-posta : nakishayal\_09@outlook.com  
Hobileri : Kitap Okuma

### **Eğitim**

<b>Derece Tarihi</b>	<b>Eğitim Birimi</b>	<b>Mezuniyet</b>
Yüksek Lisans	KSÜ, Sağlık Bilimleri, Tıbbi Biyokimya ABD	2017
Pedagojik Formasyon	GÜ, Eğitim Fakültesi	2016
Lisans	KSÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Zekeriya Bitmez Anadolu Lisesi	2006

### **YAYINLAR**

Özlem BOZKUŞ, Ergül BELGE KURUTAŞ “Beta Talasemili Hastalarda Lrp-1 ve 8-İzoprostaglandin Düzeylerinin Değerlendirilmesi” Kahramanmaraş Talasemi Sempozyumu I, 7-9 NİSAN 2016/ KAHRAMANMARAŞ (Sözlü Bildiri)

Özlem BOZKUŞ, Ergül BELGE KURUTAŞ Mehmet Akif ÇÜRÜK “Beta Talasemili Hastalarda Monoamin Ve Tau Protein Düzeylerinin Değerlendirilmesi” Kahramanmaraş Talesemi Sempozyumu I, 7-9 Nisan 2016/KAHRAMANMARAŞ