



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATİK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA
BETA GLUKAN VE MORİNDİA CİTRİFOLİA L.'NİN
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ZEYNEP BAYAT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2013

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA
BETA GLUKAN VE MORİNDİA CİTRİFOLİA L.'NİN
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ZEYNEP BAYAT

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

KAHRAMANMARAŞ 2013

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Zeynep BAYAT tarafından hazırlanan “Hepatik İskemi Reperfüzyon Hasarında Beta Glukan ve Morinda Citrifolia L.’nin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 14 / 08 / 2013 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

.....

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, KSÜ

Prof. Dr. Ertan BÜLBÜLOĞLU

.....

Genel Cerrahi Anabilim Dalı, KSÜ

Yard. Doç. Dr. Ahmet ÇELİK

.....

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, KSÜ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

.....

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

(İmza)

(Adı Soyadı)

Zeynep BAYAT

Bu çalışma KSÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2013/ 3-8 YLS

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.

**HEPATİK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA BETA GLUKAN VE
MORINDA CİTRİFOLIA L.'NİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

ZEYNEP BAYAT

ÖZET

Karaciğer iskemi-reperfüzyon (İR) hasarı, karaciğer transplantasyonu ve cerrahisiyle ilişkili önemli bir komplikasyondur. Bu çalışmanın amacı karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında antioksidan ajan olan Beta Glukan ve Morinda Citrifolia L'nin karaciğer İR hasarındaki koruyucu etkilerini araştırmaktır.

Wistar-Albino sıçanlar sham grubu (Grup 1) (n=5), İ/R (iskemi reperfüzyon) kontrol grubu (Grup 2) (n=5), Beta glukan grubu (Grup 3) (n=8), Morinda Citrifolia L. Grubu (Grup 4) (n=8) ve bu ajanların kombine uygulandığı grup (Grup 5) (n=8) olarak ayrıldı. Etken maddeler 10 gün boyunca sıçanlara oragastrik gavaj yolu ile verildi. Sham grubundaki sıçanlara, karaciğerin orta ve sol lobunu besleyen hepatik arterleri, portal ven ve safra yolu transeksiyonunu takiben herhangi bir işlem uygulanmadı. Kontrol grubundaki ve ilaç grubundaki sıçanlara 60 dakika iskemi, 60 dakika reperfüzyon uygulandı.

Deney sonunda histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar için doku örnekleri alındı. Oksidatif hasarlanmanın tespiti için malondialdehit (MDA) seviyeleri ve antioksidan enzimlerden Süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutasyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri, Total Antioksidan Kapasite, Total serbest sülfidril grup, Total Oksidan Durum ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) çalışıldı. Histopatolojik hasarın tespitinde 5 aşamalı bir skorum sistemi kullanıldı.

Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre; MDA düzeyi kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı arttı ($p<0,05$). İlaç uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı azalma vardı ($p<0,05$) fakat kombine grupta anlamlı fark yoktu ($p>0,05$).

SOD aktivitesi kontrol grubunda sham grubuna göre arttı fakat anlamlı değildi ($p>0,05$). İlaç gruplarında kontrole göre anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,05$). Kombine gruptaki artış anlamlı değildi ($p>0,05$).

GPx ve SH sonuçları istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

TAC değerleri tüm gruplarda sham grubuna göre anlamlı düştü ($p<0,05$).

TOS, kontrol grubunda sham grubuna göre anlamlı arttı ($p<0,05$). Morinda Citrifolia L grubu kontrole göre anlamlı düştü ($p<0,05$). Beta Glukan ve kombine gruptaki değişiklikler kontrole göre anlamlı değildi ($p>0,05$).

OSI sonuçlarında sadece Morinda Citrifolia L kontrole göre anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Sonuç olarak; İ/R hasarını önlemede Morinda Citrifolia L'nin en az beta glukan kadar etkili olabileceğini fakat kombine uygulamalarının tedavide herhangi bir üstünlük sağlamadığı kanısına varıldı. Histopatolojik değişikliklere etkili olup olmadığı konusunda ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, İskemi-Reperfüzyon Hasarı, Beta Glukan, Morinda Citrifolia L.

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ağustos / 2013

Danışman: Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

Sayfa sayısı: 92

**INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF BETA GLUCAN AND
MORINDA CITRIFOLIA L. ON HEPATIC ISCHEMIA- REPERFUSION INJURY
(M.Sc. THESIS)**

ZEYNEP BAYAT

SUMMARY

Hepatic ischemia-reperfusion (IR) injury is a major complication associated with liver transplantation and surgery. The aim of this study is to investigate effects of antioxidant agents, Beta glucan and Morinda Citrifolia L in hepatic ischemia reperfusion injury.

Wistar-Albino rats were separated as; Sham group (Group 1)(n=5), I/R (ischemia reperfusion) control group (Group 2)(n=5), Beta Glucan group (Group 3)(n=8), Morinda Citrifolia L. group (Group 4)(n=8) and the group which these medications were given in combination (Group 5)(n=8). The active substances were given by orogastric gavage for 10 days to rats. No other action was taken to Sham group rats following hepatic artery that feeds middle and left lobe of liver, portal vein and biliary transaction. 60 minutes ischemia and 60 minutes reperfusion were performed to the rats which are in control group and medication group.

At the end of the experiment tissue samples for histopathological and biochemical analyses were taken. In order to identify the oxidative damage, malondialdehit (MDA) levels, antioxidant enzyme (SOD, GPx) activities, total antioxidant capacity, total free sulfhydryl group ,total oxidant status and Oxidative Stress Index were studied. In the identification of histopathological damage a score system with 5 stages was used.

According to the results of the Mann-Whitney U test; MDA levels were significantly higher in the control group compared with sham group ($p < 0.05$). Drug treated groups were significantly decreased compared to the control ($p < 0,05$) but there was no significant difference in the combined group ($p > 0,05$). SOD activity increased in the control group compared with sham group, but not significantly ($p > 0,05$). Drug groups were significantly increased compared to control ($p < 0,05$). Increase in the combined group was not statistically significant ($p > 0,05$). GPx and SH results were not statistically significant ($p > 0,05$). TAC values significantly decreased in all groups compared to the sham group ($p < 0,05$). TOS, were significantly higher in the control group compared with sham group ($p < 0,05$). Morinda Citrifolia L decreased significantly compared to the control group ($p < 0,05$). Beta Glucan and the combined group was not significant compared to the control

group ($p>0,05$). OSI were significant only Morinda Citrifolia L group compared to the control ($p<0,05$).

As a result, it is thought that Morinda Citrifolia L may be effective at least as effective as beta-glucan in prevention I/R injury but, has no advantage the combined application of treatment. There are need for future studies to explain if it would affect histopathological changes.

Key Words: Liver, Ischemia-Reperfusion Injury, Beta Glucan, Morinda Citrifolia L

Kahramanmaraş Sütçü İmam University
Institute of Health Sciences
Department of Medical Biochemistry, August / 2013

Supervisor: Fatma INANC TOLUN, Professor Doctor

Page number: 92

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince her türlü bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında destek ve fikirlerini aldığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a,

Eğitimim sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Metin KILINÇ, Doç. Dr. Ergül BELGE KURUTAŐ ve Yard. Doç. Dr. Ahmet ÇELİK ile çalışma arkadaşlarım Araő. Gör. Dr. Elif ŐAHİN, Araő. Gör. Velid UNSAL ve laboratuvarında çalışan tüm yüksek lisans öğrencilerine,

Tez çalışmamda değerli katkıları olan Prof. Dr. Ertan BÜLBÜLOĞLU, Doç. Dr. Harun ÇIRALIK, Yard. Doç. Dr. Hamide SAYAR, Yard. Doç. Dr. Ahmet ÇELİK hocalarıma, Tıp Fakóltesi öğrencisi Fatih Burak UYANIK ve Deney Hayvanları Laboratuvarı personeli Abdullah YILMAZ'a

Her zaman yanımda, arkamda olan, beni yeni ufuklara yelken açmamda sınırlamayan, bilimsel araştırma yapma arzumu engin sınırlara taşıyan sevgili annem Sultan BAYAT, sevgili babam Recep BAYAT'a ve tüm kardeşlerime,

En içten teşekkürü bir borç bilirim.

Araő. Gör. Zeynep BAYAT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
SUMMARY	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR LİSTESİ	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
ÇİZELGELER LİSTESİ	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarı	3
2.1.1. İskemi	3
2.1.2. Reperfüzyon	6
2.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nötrofillerin Rolü	7
2.1.4. Komplemanın Rolü	9
2.1.5. Mast Hücrelerinin Rolü	10
2.2. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı	11
2.3. Serbest Radikallerin Oluşumu	12
2.3.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	13
2.3.1.1. Süperoksit Radikalleri (O_2^{\cdot})	15
2.3.1.2. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	16
2.3.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	17
2.3.1.4. Singlet O_2 (1O_2)	18
2.3.1.5. Hidroperoksil Radikali (HO_2^{\cdot})	18
2.3.1.6. Hipokloröz asit (HOCl)	18
2.3.1.7. Nitrik Oksit (NO)	19
2.3.2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları	19
2.3.2.1. Endojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları	20
2.3.2.1.1. Mitokondrial Elektron Transport Sistemi	20
2.3.2.1.2. Araşidonik Asit Kaskatı	20
2.3.2.1.3. Ksantin Oksidaz (XO)	20
2.3.2.1.4. Endoplazmik Retikulum	22
2.3.2.1.5. Peroksizom	22
2.3.2.1.6. Plazma Membranı	22
2.3.2.1.7. Otooksidasyon	22
2.3.2.1.8. Redoks Döngüsü	23

2. 3. 2. 1. 9. Fagositoz.....	23
2. 3. 2. 2. Eksojen Serbest Radikal oluşum mekanizması	24
2. 3. 3. Serbest Radikallerin Etkileri	24
2. 3. 3. 1. Hücre içi etkileri	24
2. 3. 3. 1. 1. Lipit Peroksidasyonu	24
2.3.3.1.2. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	26
2. 3. 3. 1. 3. Proteinlere etkileri.....	26
2. 3. 3. 1. 4. Karbonhidratlara etkileri.....	26
2. 3. 3. 2. Hücre Dışı Etkiler	27
2. 3. 3. 2. 1. Kemotaksi	27
2. 3. 3. 2. 2. Rolling	27
2. 3. 3. 2. 3. Adhezyon	27
2. 3. 3. 2. 4. Antiadhezyon Molekülleri İnhibisyonu.....	28
2. 4. Antioksidanlar	28
2. 4. 1. Enzimatik Antioksidanlar	30
2. 4. 1. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	30
2. 4. 1. 2. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	31
2. 4. 1. 3. Glutasyon Redüktaz.....	31
2. 4. 1. 4. Glutasyon-S-Transferaz (GST).....	32
2. 4. 1. 5. Katalaz (CAT)	32
2. 4. 2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri.....	33
2. 4. 2. 1. E ve C vitamini	33
2. 4. 2. 2. Karotenoidler	33
2. 4. 2. 3. Glutasyon (GSH).....	34
2. 4. 2. 4. Ürik asit (Ürat).....	34
2. 4. 2. 5. Melatonin.....	34
2. 4. 3. Total Antioksidan Kapasite (TAC).....	33
2. 4. 4. Total Oksidan Seviye (TOS).....	33
2. 4. 5. Total Serbest Sülfidril Grup (SH Düzeyi).....	33
2. 4. 6. Oksidatif Stres İndeksi (OSI).....	33
2. 5. Beta Glukan	35
2.5.1. Beta Glukanın Biyolojik Aktiviteleri.....	37
2.5.1.1. İmmün Sistem Regülasyonu.....	37
2. 6. Morinda Citrifolia L.	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3. 1. Deney Hayvanları ve modelin oluşturulması.....	41
3. 1. 1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	42

3. 2. Yöntemler	42
3. 2. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	42
3. 2. 2. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini	45
3. 2. 3. Protein Düzeyinin Tayini	48
3. 2. 4. Glutasyon Peroksidaz (GPx) aktivite tayini	50
3. 2. 5. Total Antioksidan Kapasite (TAC) Düzeyinin Tayini.....	51
3. 2. 6. Total oksidan status (TOS) düzeyi ölçüm yöntemi	51
3. 2. 7. Total Serbest Sülfidril Grup (SH) Düzeyinin Tayini.....	52
3.3. Histopatolojik Değerlendirme.....	52
3. 4. İstatistik.....	52
4. BULGULAR.....	53
4. 1. Biyokimyasal analiz sonuçları	53
4.2. Histopatolojik analiz sonuçları.....	59
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇLAR.....	61
7. KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ.....	76

KISALTMALAR LİSTESİ

ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
İ/R	: İskemi Reperfüzyon
İRH	: İskemi Reperfüzyon Hasarı
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
PLC	: Fosfolipaz C
PIP2	: Fosfotidil İnozitol Bifosfat
DAG	: Diaçilgliserol
IP3	: İnozitol Trifosfat
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
O₂^{•-}	: Süperoksit Anyon Radikali
HOCl	: Hipoklorik Asit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
IL-6	: İnterlökin 6
IL-1β	: İnterlökin 1 Beta
IL-12	: İnterlökin 12
CXC	: Sistein-X Amino Asit-Sistein
JNK-1	: c-jun N-Terminal Kinaz-1
PNL	: Polimorfonükleer Lökositler
NL	: Nötrofil Lökosit
SEH	: Sinüzoidal Endotel Hücreler
XO	: Ksantin Oksidaz
C5a	: Kompleman 5a
LB4	: Lökotrien B4
NO	: Nitrik Oksit
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
İNF-γ	: Gamma İnterferon
ICAM-1	: İntersellüler Adhezyon Molekülü
ELAM-1	: Endoteliyal Lökosit Adhezyon Molekülü-1
MCP-1	: Lökosit-Monosit-Kemoatraktan Protein- 1

NFκB	: Nükleer Transkripsiyon Faktörü B
VCAM-1	: Vasküler Sellüler Adhezyon Molekülü
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
SMA	: Süperior Mezenterik Arter
O₂	: Oksijen
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
HO₂[•]	: Perhidroksi Radikali
OH[•]	: Hidroksil Radikali
¹O₂	: Singlet Oksijen
NO[•]	: Nitrik Oksit Radikali
H[•]	: Hidrojen Radikali
RNA	: Ribonükleik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
ROO	: Peroksil Radikalleri
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
FMN	: Flavın Mononükleotit
BH₄	: Tetrahidrobiopterin
ETS	: Elektron Transport Sistemi
PGG	: Prostaglandin G
PGH	: Prostaglandin H
XDH	: Ksantin Dehidrogenaz
-SH	: Tiyol
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
L[•]	: Yağ Asidi Zincir Radikali
L-O₂[•]	: Lipit Peroksil Radikali
MDA	: Malondialdehit
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit ile Reaksiyona Giren Maddeler
GSSG	: Okside Glutasyon
GSH	: Redükte Glutasyon
GR	: Glutasyon Redüktaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz

GS-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle spektrometresi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
Araf	: Arabinoz
Galp	: Galaktoz
GalAp	: Galakturonik asit
RHAP	: Ramnoz
DHLA	: Dihidrolipoik Asit
ONOO[•]	: Peroksinitrit Radikali
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
OD	: Optik Dansite
MOF	: Multipl Organ Yetmezliği
TAC	: Total Antioksidan Kapasite
TOS	: Total Oksidan Durumu
SH	: Tiyol

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1: Hücre membranı normal iyon dengesi	4
Şekil 2: İ/R'da endotel hasarı ve lipid peroksidasyonunu gösteren şema.....	7
Şekil 3: İskemi reperfüzyondan sonra lökositlerin endotel hücrelere yapışması ve interstisyel alana geçişini gösteren şematik resim	9
Şekil 4: Oksijen atomlarının yapısı	13
Şekil 5: Oksijen moleküllerinin yapısı	14
Şekil 6: XD-XO'a dönüşümü ve serbest oksijen radikallerinin oluşumu	21
Şekil 7: Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehitler	26
Şekil 8. Beta-glukanın moleküler yapısı	36
Şekil 9. Makrofajlar, beta glukanları tanıyan ve onlara bağlanan reseptörlere.....	38
Şekil 10. Makrofajlar beta-glukanların etkilerine aracılık ederler.....	38
Şekil 11: Süperoksit dismutaz standart eğrisi.....	45
Şekil 12: Malondialdehit standart eğrisi	47
Şekil 13: Protein standart eğrisi.....	49
Şekil 14: Grupların MDA düzeyleri	56
Şekil 15: Grupların SOD enzim aktivitesi.....	56
Şekil 16: Grupların GPx enzim aktivitesi	57
Şekil 17: Grupların TAC düzeyleri.....	57
Şekil 18: Grupların TOS düzeyleri	58
Şekil 19: Grupların SH düzeyleri	58
Şekil 20: Grupların OSI düzeyleri	56
Şekil 21: Sham Grubu Hemotoksilen-Eozin(HE)x100.....	60
Şekil 22: Kontrol Grubu HEx100	60
Şekil 23: Beta Glukan Grubu HEx100.....	61
Şekil 24: Morinda Citrifolia L. Grubu HEx100	61
Şekil 25: Beta Glukan+Morinda Citrifolia L. Grubu HEx100.....	61

ÇİZELGELER LİSTESİ

	Sayfa No
Çizelge I: Oksijen türevi bileşikler	14
Çizelge II: Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler.....	23
Çizelge III: Antioksidanların sınıflandırılması.....	29
Çizelge IV: Antioksidan savunma mekanizması	30
Çizelge V: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	43
Çizelge VI: SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerinin hazırlanışı.....	44
Çizelge VII: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı.....	45
Çizelge VIII: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	46
Çizelge IX: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı.....	49
Çizelge X: Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	49
Çizelge XI: Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı	49
Çizelge XII: Doku örneğinde GPx tayini için tüplerin hazırlanışı	50
Çizelge XIII: Deney gruplarında biyokimyasal parametreler (ort ± SS).....	55
Çizelge XIV: Grupların histopatolojik analiz sonuçları	59

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi, hücre enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikimine yol açarak, hücre fonksiyon bozukluğundan hücre ölümüne kadar giden bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır. İskemik dokunun tekrar kanlanması reperfüzyondur, enerji gereksiniminin geri kazanılması ve toksik metabolitlerin ortamdaki uzaklaştırılması için gereklidir. Ancak, iskemi sırasında oluşmuş toksik metabolitlerin ve çeşitli inflamatuvar mediatörlerin sistemik dolaşıma verilmesi ile ciddi metabolik bozukluklar oluşabilir ve reperfüzyon daha ileri doku hasarına yol açabilir (1). İskemi reperfüzyon hasarı (İRH), hipoksik organın tekrar oksijenlenmesi ardından ortaya çıkan hücre hasarlanmadır. Karaciğerde iskemi-reperfüzyon hasarı ilk kez 1975'de Toledo-Pereyra ve arkadaşlarının deneysel olarak gerçekleştirdikleri karaciğer naklinde gözlenmiştir. Nakledilmiş karaciğerde konjesyon, ilerleyici tromboz, organ yetmezliği ile sonuçlanan greft nekrozu gelişmiştir (2). Karaciğer iskemisi nakil cerrahisinden başka, travma, kanser, safra yolu tıkanmaları ve darlıkları nedeniyle ameliyat edilen hastalarda, ayrıca cerrahi girişim olmaksızın bir hemodinamik veya kardiyojenik şok periyodunu takiben oluşabilmektedir. Karaciğer İRH patofizyolojisi, karaciğer hasarına yol açan birçok mekanizmanın katılımından meydana gelir. Kupffer hücre aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu, sitokin ve kemokin salgılanması, vazokonstriksiyon, nitrik oksit ve endotelin dengesindeki bozulma, nötrofil lökositlerin toplanması, mitokondriyal geçirgenliğin değişikliğe uğraması, kalsiyumun (Ca²⁺) hücre içine dengelenmemiş geçişi ve pH paradoksu gibi çeşitli hücre ve moleküler etkileşimler söz konusudur. Bu kompleks mekanizmalar hücre ölümüne, organ fonksiyon bozukluğuna ve en sonunda da organ kaybına neden olmaktadır (3).

İskemi reperfüzyon hasarından sorumlu olduğu düşünülen patofizyolojik mekanizmaları bloke edeceği düşünülen birçok hepatosit koruyucu ajan; allopurinol, α-tokoferol, mannitol, dopamin, prostoglandin, aktive karbon hemoperfüzyonu, glukagon, melatonin, karnitin, klorpromazin, aprotonin, metil prednizolon, deferoksamin, siklosporin, katalaz, aspartik asit, ubiquinon, trombosit aktive edici faktör antagonistleri, adenozin trifosfat (ATP), verapamil, nifedipin, süperoksit dismutaz tanımlanmış ve bunların İRH üzerine iyileştirici etkileri deneysel İR modellerinde araştırılmıştır (4, 5).

Glukanlar, bazı bitkilerin, bakterilerin ve fungusların hücre duvarının majör içeriği olan glikoz polimerleridirler. Beta glukanlar güçlü immün stimülatörler olarak kabul edilmektedirler. Hem doğal immüniteyi hem de adaptif immüniteyi etkilemektedirler (6).

Literatürde, beta glukanların antioksidan etkilerinin yanı sıra antitümör, antiviral, antibakteriyel, antifungal aktivitelerinin olduğunu, yara iyileşmesine yararlı etkileri olduğunu ve skar dokusunu azalttığını gösteren yayınlar bulunmaktadır (7). Çözülebilir beta glukan, oral olarak alındığında gastrointestinal sistemden emilerek sistemik dolaşıma katılmaktadır. Dolaşıma katılan beta glukan, monositler ve nötrofiller üzerindeki reseptörlere kompetitif olarak bağlanmaktadır. Ayrıca makrofaj sitotoksitesini ve fagositik kapasitesini arttırmaktadır (8).

Morinda Citrifolia L (Noni) 2000 yıldan beri Polinezyalılar tarafından, halk yapımı ilaçlarda kullanılmakta olan bir bitkidir (9). Noni bitkisinin kökleri, sapları, kabukları, yaprakları, çiçekleri ve meyvası; 40 kadar bilinen ve kayıtlanan bitkisel tedavide, farklı bileşimler içinde kullanılmıştır (10). Noni meyvesi, Prokseronin olarak tanımlanan Kseronin'in doğal ön maddesini içermektedir. Prokseronin vücutta Prokseroninaz enzimi ile alkaloid Kseronin'e dönüşmektedir (11). Kseronin geniş kapsamlı biyolojik etkiler içermektedir. Hücre içinde, proteinin yapısından kaynaklanan bir sorun oluştuğunda, Kseronin'in fonksiyonu katkı sağlamaktadır. Antibakteriyel, antiviral, antifungal, antitümör, antihelmintik, analjezik, hipotansif, anti-enflamatuar ile bağışıklığı güçlendirici geniş kapsamlı terapötik etkiler içerdiği bildirilmiştir (12).

Bu bahsedilen koruyucu özellikleri nedeniyle Beta Glukan ve Morinda Citrifolia L.'nin literatürde çalışılmış birçok bilimsel çalışma mevcuttur. Ancak karaciğer İRH üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Biz bu çalışmamızda Morinda Citrifolia L. nin İRH'yi koruyucu özelliği olduğunu düşünerek Beta Glukan ile birlikte etkilerini, biyokimyasal yönlerden karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. İskemi Reperfüzyon Hasarı

2. 1. 1. İskemi

İskemi; kan akımının azalması yani oksijen ve besin maddelerinin dokulara yeterince ulaşamaması durumudur. İskemi, süresine ve organı perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre zedelenmesine yol açabilmektedir (13).

İskemi sonucu hipoksi oluşmakta oluşan hipoksi ise aerobik oksidatif solunumu etkileyerek, son derece önemli ve genel bir hücre zedelenme ve ölüm nedeni olmaktadır. İskemi uzun süre devam ettiği takdirde enerji eksikliğine bağlı olarak aşağıdaki olaylar oluşur (14).

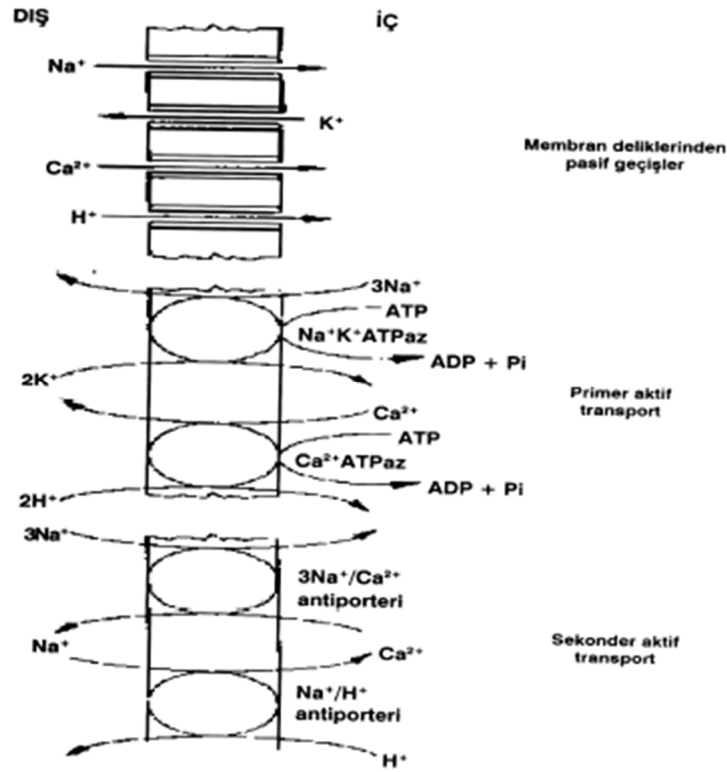
İskemi sonucu oksijenin azalması, krebs döngüsüyle aerobik oksidasyonda azalmaya ve hücrede bulunan adenzin trifosfat (ATP) miktarında düşüşe neden olur. Bu durum adenzin difosfat (ADP) ile fosfat birikimine ve Embden- Meyerhoff yolundaki anaerobik glikolizde artmayla sonuçlanır. Laktik asit ve pürivik asit birikir. Laktat artışı ve H^+ birikimi doku pH'sında düşmeye neden olur. Laktik asit ve düşük pH, protein parçalanması, enzim fonksiyonlarında kayıp, nikotinamid dinükleotid fosfat (NADPH) rejenerasyonunun engellenmesi ve serbest radikal oluşumu gibi iskemik hasar oluşturan etkenlerin gelişimini artırır (15).

Adenzin trifosfat seviyesindeki azalma ile birlikte fosfolipit, protein, polisakkarit ve nükleik asitlerin kendiliğinden veya enzim kaynaklı parçalanmalarının ardından bu yapı taşlarının yeniden sentezlenememesi nedeniyle hücre bütünlüğü bozulmaya başlar. Aynı zamanda hücre içi Ca^{2+} artmasına bağlı fosforilaz, lipaz, proteaz ve endonükleaz enzim aktivasyonları da bu parçalanmaya katkıda bulunur (15).

İskeminin ciddiyetine ve süresine göre hücre membranının fizyolojik bütünlüğü bozulmaya başlar. İskeminin ilk etkilediği yer mitokondridir. ATP miktarındaki net azalma Na^+/K^+ ATPaz enzimini inhibe eder. Buna bağlı olarak hücre içi Na^+ ve su artışı ile hücrede şişme meydana gelir. Hücre dışı K^+ miktarı artar. Na^+ un hücre içi artışı ile Na^+/Ca^{2+} ve Na^+/H^+ değişim sistemleri aktive olur. Sonuçta hücre içine Ca^{2+} ve H^+ akışı başlar. Hücre içi Na^+ artışı membranda depolarizasyon yaparak, geçici voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarının açılmasına ve hücre içi Ca^{2+} miktarının artmasına neden olur. Hücre içinde Ca^{2+} artması fosfolipazı aktive eder ve fosfolipidlerin parçalanmasına neden olur.

Araşidonik asit ortaya çıkar ve böylece serbest radikal oluşturan siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolları aktive olur (16).

Sitoplazmada artan serbest Ca^{2+} , Ca^{2+} 'a bağımlı ATPaz enzimini aktive eder ve hücre içi ATP daha hızlı tüketilir. Yüksek Ca^{2+} seviyeleri mitokondri iç zara etki ederek oksidatif fosforilasyonu ve ATP yapımını azaltır. Yüksek Ca^{2+} seviyelerinin, proteaz aktivasyonu sonucu ksantin oksidaz enziminin iskemik dokuda ortaya çıkmasında, nötral proteazlar ve lizozomal proteazların aktivasyonu ile hücre iskeletini oluşturan protein yapıların yıkılması sonucu geri dönüşümsüz hasarda rol oynadıkları ortaya konmuştur (15) (Şekil 1).



Şekil 1: Hücre membranı normal iyon dengesi (15).

İskemi reperfüzyon (İ/R) hasarının gelişmesinde son derece önemli olan hücre içi Ca^{2+} artışı başlıca üç yolla olmaktadır;

ATP'nin tükenmesi ile birlikte aktif Na^+ transport pompaları (Na^+/K^+ ATPaz, Na^+/Ca^{2+} ve Na^+/H^+ değişim sistemleri) bozulur ve hücre içine Ca^{2+} girişi başlar (15).

Hücrelerde belli uyarılarla hücre içi depolardan hücre membranı reseptörü aracılığı ile Ca^{2+} serbestlenmesi gerçekleşmektedir. Agonistin G proteini aracılığı ve fosfolipaz C (PLC) ile eşlenmiş olarak bulunan reseptöre bağlanması, fosfotidil inozitol bifosfat

(PIP2)'in diaçilgliserol (DAG) ve inozitol trifosfat (IP3)'a ayrılmasına neden olmaktadır. IP3, endoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımını gerçekleştirmektedir (15).

Hücre içine giren veya intrasellüler olarak salgılanan Ca^{2+} iki şekilde tamponlanmaktadır. Bunlardan birincisi kalmodilin gibi efektör bir proteine veya kalsibindin gibi özel bağlayıcı proteine bağlanarak gerçekleşmektedir. Ca^{2+} negatif gruplara bağlanarak tamponlanması, hidrojen iyonunun tamponlanması ile benzerlik gösterdiğinden, Ca^{2+} ve H^+ aynı tampon bölgeleri için yarışa girerler. Bu nedenle, iskemi sonucu gelişen asidozda Ca^{2+} , bu bağlanma bölgelerinden salınmaktadır. Hücre içi Ca^{2+} 'un bir diğer tamponlanma şekli de hücre içi organeller tarafından tutulma yoluyla. Ca^{2+} 'un endoplazmik retikulum, mitokondri gibi organellerce tutulması enerji gerektiren bir olaydır. Normal koşullarda, mitokondrinin tutuluma katkısı çok azdır (17). Hücre içi Ca^{2+} yoğunluğu hızla artınca mitokondri büyük miktarlarda Ca^{2+} 'u tutar. Bunun için mitokondri iç membranının elektriksel potansiyeli gerekmektedir. Bu potansiyel de sadece O_2 ve ATP varlığında oluşturulabilmektedir. Mitokondrinin çok miktarlarda Ca^{2+} tutması mitokondrial hasarı oluşturan en önemli nedenler arasındadır. İtrasellüler Ca^{2+} artışını tamponlayan mekanizmalar arasında bulunan mitokondride Ca^{2+} tutuluşu iskemi sırasında mitokondrinin Ca^{2+} ile aşırı yüklenmesine neden olmaktadır. İskeminin ilk dakikalarında oksijen konsantrasyonu düşüklüğüne bağlı olarak durma noktasına gelen hücrenin solunum fonksiyonları ve ATP sentezi, mitokondrideki bu Ca^{2+} birikimi ile daha da bozulmaktadır. Böylece hücrede ATP eksikliği ile başlayan iskemik sürecin gelişiminde, hücre içi Ca^{2+} artışının bir sonucu olarak ATP sentezi giderek azalmakta ve olaylar kısır bir döngü içine girmektedir (15).

İskemi de enerji eksikliği sonucu gelişen olayların bir diğer sonucu da ATP yıkım ürünlerinin birikmesidir. İskemi sırasında ATP oluşumunun bozulmasına karşın, mevcut ATP'nin hidrolizi sürmektedir. ATP hidrolizi ile hipoksantin, ksantin gibi pürin metabolitleri hücre içinde birikmektedir. Bu metabolitlerin reperfüzyon sırasında ortama gelen moleküler oksijenin ksantin oksidaz tarafından kullanılarak meydana gelen reaksiyonları, İ/R hasarından dokuya göre değişen derecelerde sorumlu tutulan serbest radikallerin en önemli kaynağını oluşturmaktadır (18).

2.1.2. Reperfüzyon

İskemi esnasında oluşan birçok olay reperfüzyon esnasında oluşacak olan hasarlara zemin hazırlar. McCord tarafından yapılan birçok çalışmada, iskemi sırasında oluşan hasarların reperfüzyon hasarları için başlangıç teşkil ettiği ileri sürülmüştür (19).

İskemi esnasında hücresel enerji depolarının tükenmesi, iskemik kaskat olarak bilinen olaylar zincirini tetiklemektedir. İskemik dokunun reperfüzyonu ise bir taraftan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesini sağlarken diğer taraftan oksijen bolusu ile oksijen kaynaklı serbest oksijen radikallerin (SOR) oluşumunu hızlandırarak daha ileri hasarlara yol açmaktadır (20).

Serbest radikaller hücre mitokondrisine çok hasar vermektedir. Bu nedenle stratejik olarak farmakolojik ajanlarla serbest radikal oluşumunun önlenmesi ya da ortamdaki temizlenmesinin hücre hasarını azaltacağı düşünülmektedir (17).

Deneysel çalışmalar, reperfüzyonun akut faz esnasından önceki iskemik doku üzerine ek bir hasar yüklediğini göstermiştir. Reperfüzyon hasarı olarak bilinen bu ardışık olaylar; intrasellüler enzimlerin salınımını artırarak, Ca^{2+} 'un hücre içine girişine, sarkolemmal fosfolipitlerin bozulmasına ve hücre membranlarının dağılmasına neden olur. Bütün bunlar tek başına veya kombine olarak sonunda hücre ölümüyle sonuçlanır. Bu değişiklikler, iskemi esnasında değil de, daha çok reperfüzyon esnasında meydana geldiğinden “reperfüzyon hasarı” olarak bilinir. Reperfüzyon hasarının bilinen en az üç bileşeni mevcut olup bunlar; mikrovasküler hasar, hücre nekrozu ve hemorajidir. İskemiye maruz kalan her organda reperfüzyon hasarı oluşup, iskemi esnasında biyokimyasal olayların oluşumuyla kendini gösterir ve sonuçta süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hipoklorik asit (HOCl) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen metabolitleri yanında Ca^{2+} artar ve sarkolemmal fosfolipitlerin kaybı meydana gelir (19, 21).

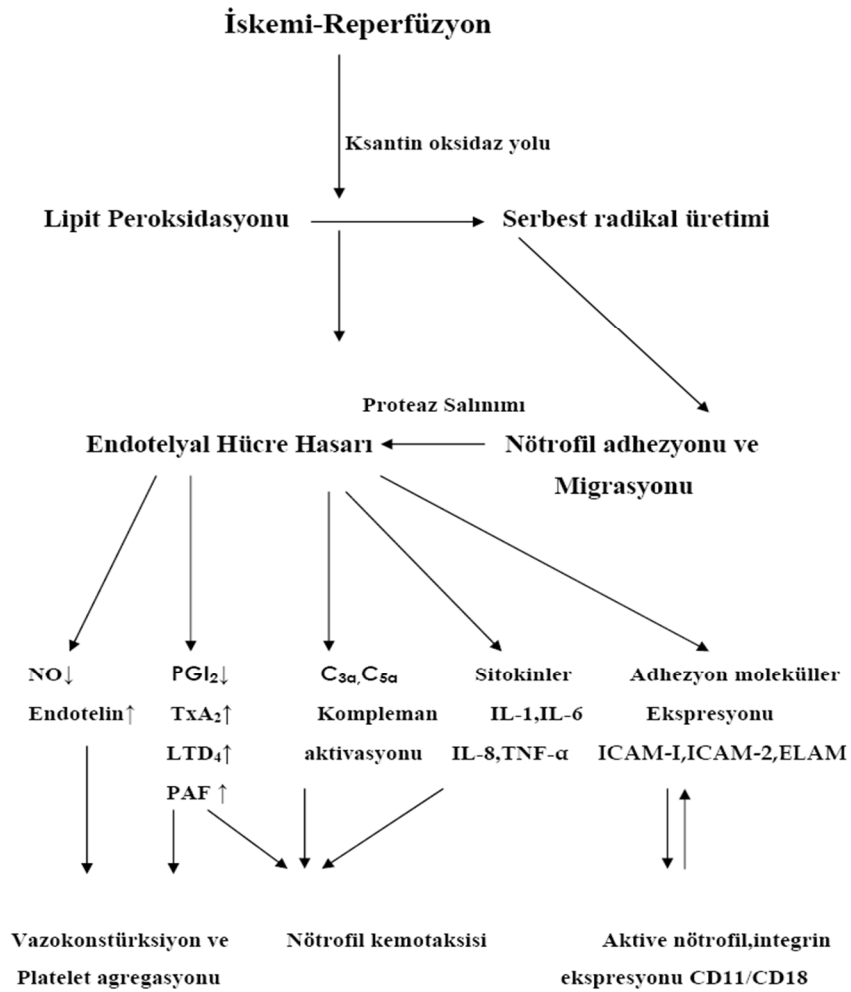
Başta makrofajlar olmak üzere dolaşım ve parankimdeki diğer inflamatuvar hücrelerden SOR yanı sıra; tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin 6 (IL-6), interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin 12 (IL-12) ve sistein-X amino asit-sistein (CXC) kemokinler gibi proinflamatuvar sitokinler de ortama salınır (20).

Sitokinlerin de etkisi ile vasküler yatağı döşeyen endotel hücrelerinde adhezyon moleküllerinin (ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin) ekspresyonu artar ve buna koşut olarak nötrofillerin endotel yüzeyine karşı olan ilgisi fazlalaşır. Endotele yapışan nötrofiller daha sonra hücre aralıklarından parankime doğru ilerleyerek fagositoz ve lizozomal enzimlerin de yardımı ile hasarın ilerlemesine yardımcı olurlar. Reperfüzyon hasarı lokal olduğu

kadar, sitokinler yoluyla uzak organlarda da inflamatuvar yanıtı indükleyerek organ yetmezliklerine neden olabilirler (22) (Şekil 2).

Son yıllarda T lenfositlerin de İ/R hasarında rol aldığı ve T hücre aktivitesinin engellenmesi ile (örn. kalsinürin inhibitörleri) iskemiye takip eden parankim hasarının azaltılabildiği gösterilmiştir (23).

Ayrıca stres ile aktive olan protein kinazlardan c-jun N-terminal kinaz-1 (JNK-1), İ/R sırasında transkripsiyon faktörlerini etkileyerek değişik proinflamatuvar sitokinlerin indüklenmesine ve hücrede apoptozun başlamasına neden olabilmektedir (24).



Şekil 2: İ/R’da endotel hasarı ve lipit peroksidasyonunu gösteren şema (25).

2.1.3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nötrofillerin Rolü

İskemi sürecinden sonra reperfüze olan bölgeye lökositlerin, özellikle polimorfonükleer lökositler (PNL) olan nötrofillerin infiltrasyonu reperfüzyon hasarının önemli bir nedenidir (26). Bilindiği gibi nötrofiller fagositoz olayı ile canlı enfeksiyöz ajanlardan koruyan kan hücreleridir. Yapılan çalışmalarda, iskemik hücrelerin, kemoatraktan maddeleri ve adhezyon moleküllerini salgılayarak, nötrofil ve trombositlerin vasküler endotele adhezyonuna dolayısıyla inflamatuvar yanıtı yol açtığı gösterilmiştir (27, 28).

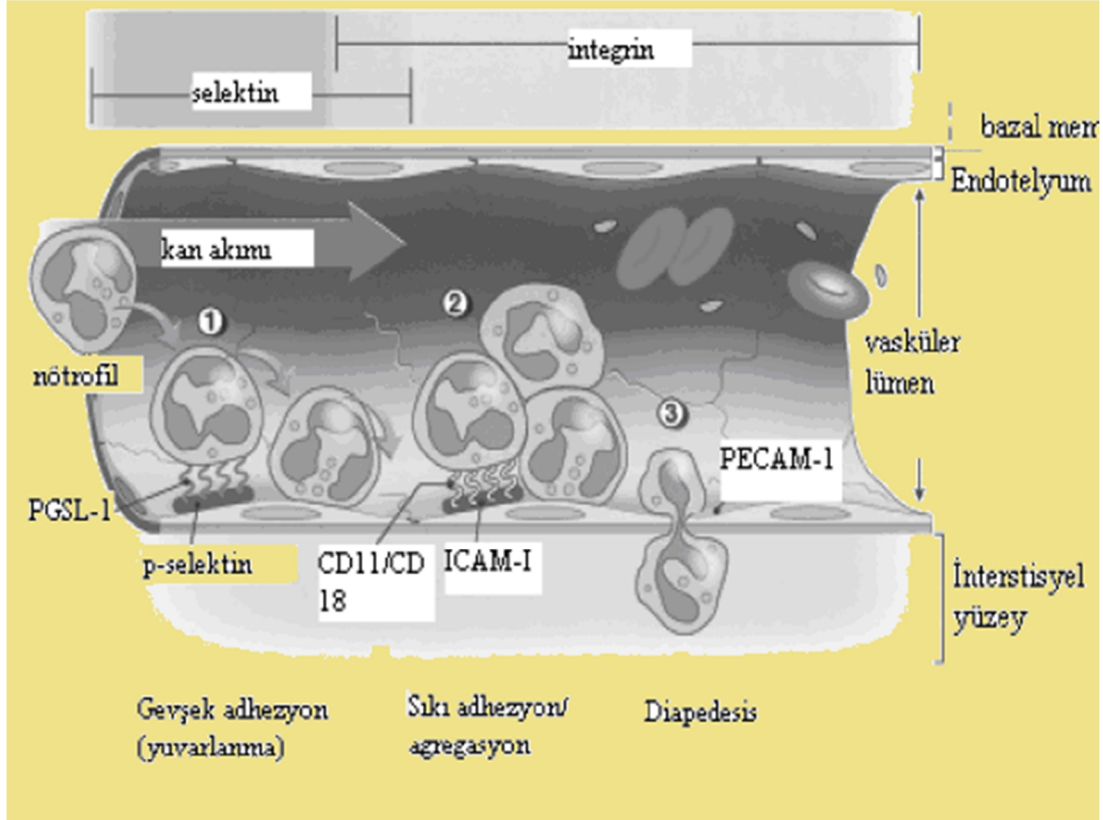
Nötrofillerin kemotaksisinde rol alan en önemli olay ksantin oksidaz (XO) reaksiyonu sırasında ortaya çıkan süperoksit anyon radikalleridir. Diğer ajanlar ise, kompleman 5a (C5a) kompleman 3a (C3a), araşidonik asit metabolitleri, özellikle lökotrien B4 (LB4), nitrik oksit (NO), trombosit aktive edici faktör (PAF), interlökin -1, 6, 8 (IL-1, 6, 8), gamma interferon (İNF- γ) ve TNF- α gibi sitokinlerdir (29). Kemotaktik faktörlerin sentezi ve salınması ile birlikte, hem nötrofil hem de endotel hücresinde lokalize olan adhezyon moleküllerinin artışında başlamaktadır. Nötrofil-endotel etkileşimini sağlayan adhezyon molekülleri, glikoprotein yapısındadırlar. Nötrofiller üzerinde bulunan bazı adhezyon molekülleri; lökosit β 2 integrinler (CD11/CD18) ve lökosit adhezyon molekülü -1 (LAM -1 veya L-selektin) dir. Endotel hücresi üzerinde bulunanlar ise; intersellüler adhezyon molekülü -1 (ICAM-1), endoteliyal lökosit adhezyon molekülü-1 (ELAM-1 veya E-selektin) ve P-selektindir (28, 30).

Nötrofiller, adhezyon molekülleri aracılığı ile etkileşime girdikleri endotel hücreleri arasında ilerleyerek (diapedez olayı) ekstrasvasküler dokuya doğru göç ederler (Şekil 3). Aktive olmuş nötrofiller, antimikrobiyal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyon sırasında gelen moleküler oksijeni kullanıp seri reaksiyonlar sonucunda ($O_2^{\bullet-}$), (H_2O_2), (OH^{\bullet}), (HOCl) ve kloraminleri oluşturarak, ileri doku hasarına neden olurlar (16).

Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akışının geri dönmemesi fenomenine (no reflow), aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçları oluşturduğu bildirilmiştir (31). Nötrofiller bozulan mikrovasküler bariyerden, dokuya geçerken beraberinde damar içi sıvı da dokuya kaçarak, ödem oluşumuna neden olur. Geri dönüşümsüz hasar, bu noktada " No Reflow " fenomeni ile ortaya çıkar. Bu fenomen mikrovasküler bariyerin bozulması ile dokuya kaçan sıvının, interstisyel basıncı arttırarak,

kapillerleri sıkıştırması ve kan akımını durdurması şeklinde tanımlanır. Dokudaki kan akımı, kapiller düzeyde engellenerek, hücre beslenmesi bozulur (32).

Reperfüzyon hasarının patogenezinin lökosit infiltrasyonunun sorumlu olduğu, birçok çalışma ile de kanıtlanmıştır. Antinötrofil serum, kemoterapotik kullanımı ya da radyasyona maruz tutularak lökopeni yapılan deney hayvanlarında, iskemi sonrası doku hasarının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (33, 34).



Şekil 3: İskemi reperfüzyondan sonra lökositlerin endotel hücrelere yapışması ve interstisyel alana geçişini gösteren şematik resim (35).

2.1.4. Komplemanın Rolü

İskemi-reperfüzyon hasarı, kompleman aktivasyonu ve bazı proinflamatuvar mediatörlerin oluşmasına yol açar. Anafilotoksinler (C3a,C5a) ve membran atak kompleksleri (C5b-9) İ/R hasarında önemli bir role sahiptir. Proinflamatuvar mediatörlerden C5a, C3a'dan yaklaşık 20 kat daha potenttir. Ek olarak C5a, lökosit aktivasyonunun ve kemotaksisinin stimülasyonu yoluyla; lökosit-monosit-kemoatraktan protein- 1(MCP-1), TNF- α , IL-1, IL-6 gibi inflamatuvar ürünlerin artışı sağlar. iC3b,

C3b'den oluşur. C5b-9 ve iC3b vasküler hemostazı değiştirebilir. Vasküler endotelial- β 2 integrin, CD11-b ve CD18 (MAC-1) lökosit adhezyonu için spesifik bir ligandır. Ek olarak CD5b-9 kompleksi, lökosit adhezyon moleküllerinin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu artıran endotelial hücrelerdeki Nükleer Transkripsiyon Faktörü B (NFkB)'yi aktive eder. Vasküler sellüler adhezyon molekülü (VCAM-1), ICAM-1, E-Selektin, P-Selektin gibi endotelial lökosit adhezyon molekülleri komplemandan etkilenir. C5b-9, lökosit aktivasyonu ve kemotaksisini endotelial IL-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 salınımı yolu ile tetikler. Sonuç olarak C5b-9 endotelial relaksasyon ve endotelial siklik guanozin monofosfat (cGMP)'yi azaltarak vasküler tonusta değişikliğe neden olur. Sonuçta kompleman aktivasyonu iskemik organlarda vasküler hemostazı değiştirip kan akımında değişikliklere ve lökositin endotele adhezyonun artmasına neden olabilir (36).

2.1.5. Mast Hücrelerinin Rolü

Mast hücreleri, bağ dokularında yerleşim gösteren granüllü hücrelerdir. Mast hücre granülleri başta heparin ve histamin olmak üzere triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, katepsin C ve G nötral proteazları gibi çeşitli mediyatörleri içerirler. Histamin ve heparine üçüncü büyük bir komponent olarak bağlanan nötral proteazlar, optimal olarak nötr pH'da fonksiyon gören ve peptit bağlarının koparılmasını katalize eden enzim grubudurlar. Proteazlar dört sınıfa ayrılırlar. Bunlar; serin proteazlar, metalloproteazlar, aspartik proteazlar ve sistein proteazlardır (37).

Diğer bağışıklık sistem hücrelerini inflamasyon ve iltihap alanına toplaması mast hücrelerinin en önemli fonksiyonlarından biridir. Mast hücresi sinir hücreleriyle yakın anatomik ve fonksiyonel temas içindedir. Damar geçirgenliği, mast hücrelerinin damar, sinir hücresi ve lökositleri modüle eden multifonksiyonel akson-refleks mekanizması ile düzenlenmektedir. Histamin, prostaglandin ve lökotrienlerin vazodilatasyona yol açtığı; TNF- α , IL-4 ve IL-13'ün lökositler için kemotaktik olduğu ve aynı zamanda endotelde adhezyon molekülleri olan ICAM-1, VCAM-1, P/ E-selektin ekspresyonunu uyardığı bilinmektedir. İnflamatuar bağırsak hastalığı, interstisyel nefrit ve romatizmal hastalıklarda dokularda mast hücrelerinin artması söz konusudur. İnflamasyonlu dokulardan yapılmış biopsilerde degranüle olmuş mast hücrelerinin çoğunlukta olduğu görülmüştür. Bu bulgular mast hücrelerinin aktif inflamatuvar olaylara katıldığına işaret etmektedir (38).

2.2. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı

İskemi reperfüzyon hasarı, hipoksik organın tekrar oksijenlenmesinden sonra ortaya çıkan hasarlanmadır. Karaciğere gelen kanın %70–80'i portal venden, geri kalan kısmı ise hepatik arterden gelmektedir. Karaciğerin dolaşım sistemindeki yeri, metabolitlerin biriktirilip taşınması, toksik maddelerin nötralize ve elimine edilmesi için oldukça uygundur (39). İkili kan desteği ve glikojen depolarının yüksek anaerobik metabolizma kapasitesine rağmen karaciğerde hipoksik hasarlanma meydana gelebilmektedir. Porta hepatis'in çapraz klemlenmesi ile hepatik arter ve portal venin oklüzyonu "Pringle manevrası" olarak adlandırılır. Karaciğerin geniş yaralanmalarında onarma, karaciğer nakli, hepatik rezeksiyon sırasında kanama kontrolü için yararlı bir manevradır. Ancak klemlenme süresi uzun tutulduğunda karaciğer İR hasarına neden olabilir. Karaciğer reperfüzyon hasarı, sıcak İRH ve soğuk-depolama reperfüzyon hasarı olarak sınıflanabilir. Sıcak İRH klinik olarak karaciğer cerrahisi ile ilişkilidir. Karaciğer nakli, hipovolemik şok, bazı tip toksik karaciğer hasarları, veno-oklüziv hastalıklar, Budd-Chiari Sendromu gibi durumlarda meydana gelir. Soğuk depolama reperfüzyon hasarı ise nakil öncesi organ korunması sırasında oluşmaktadır (40). Sıcak İRH'ında iki evre söz konusudur. Başlangıç evresi (reperfüzyon ardından iki saatten kısa) oksidan stresle karakterizedir. Reaktif oksijen türleri üretimi ve salgılanması doğrudan hepatositlerde hasarlanmaya neden olur. Geç evre ise hepatik reperfüzyondan 6–48 saat sonraki dönemdir. İnflamatuvar durum toplanan nötrofil lökosit (NL) aracılığıyla gerçekleşir (41). İR patofizyolojisinde karmaşık mekanizmalar rol oynar. Erken dönemde endotel hücrelerinin şişmesi, vazokonstrüksiyon, NL birikimi, sinuzoidlerde trombosit birikimi olur ve mikrodolaşım bozulur. İntrasellüler ödem nedeniyle, sinuzoidal endotel hücreler (SEH) ve Kupffer hücresinde şişme meydana gelir. İskeminin neden olduğu enerji azalması sonucunda aktif membran transport yetmezliği meydana gelir (42). Vazokonstrüksiyon, nitrik oksit (NO) ve endotelin dengesindeki bozulma sonucu ortaya çıkar. Sinuzoidal lümen daralır, bunu takiben NL'nin hızı yavaşlar.

Nötrofil lökositin endotel ile temas süresi artar ve böylece lökostazis gerçekleşir. Bu durumda sinuzoidal dolaşım engellenir (42, 43). Bu durum hipoksiyi uzatır. Ardından Kupffer hücreleri, NL'ler aktive olur, inflamatuvar sitokinler (43) ve oksijen kökenli serbest radikaller (1, 4, 40-42) ortaya çıkar, hepatik hasar daha da şiddetlenir.

2.3. Serbest Radikallerin Oluşumu

Serbest radikaller aerobik hücrede metabolik süreçlerde üretilirler. Fazla miktarda üretildiklerinde lipit, protein, karbonhidrat ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi hücre içi biyomoleküllerin fonksiyonlarında istenmeyen etkilere neden olurlar. Biyomoleküllere sadece serbest radikaller değil, radikal olmayan reaktif oksijen türleri ve nitrojen türleri de etki etmektedir (44).

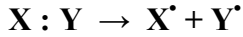
Atom; proton, nötron parçacıklarını içeren çekirdek ve çekirdeğin çevresinde bulunan başka atomlarla kimyasal bağ yapma özelliğine sahip negatif yüklü elektronlardan oluşur. Çekirdek etrafında bulunan elektronun pozisyonu her zaman kesin lokalize olmayabilir, ancak uzaydaki konumu yaklaşık olarak bellidir. İşte bu elektronun çekirdek çevresinde bulunduğu enerji düzeylerine yörünge denmektedir. Her bir yörüngenin enerji değerine kuantum düzeyi denir ve k, l, m, n, şeklinde gösterilir. Çekirdeğe en yakın düzey olan k düzeyi en düşük enerji değerine sahiptir. Atomun en dış kısmında bulunan elektronlar ise en yüksek enerjili elektronlardır. Atomda en aktif olan ve kimyasal tepkimelerinin çoğunun olduğu yer de bu en dış kısımdır. En dışta bulunan elektronların atomdan uzaklaşması veya yörüngeye bir elektron eklenmesi sonucunda iyonlar oluşur. Atom elektron kaybederse pozitif, kazanırsa negatif yüklü iyon olur. Her bir yörüngede en çok iki elektron bulunur. Eğer bir yörüngede tek elektron bulunur ise o elektron eşleşmemiş olarak adlandırılır. Bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektronu bağımsız bulundurma yeteneği olan herhangi bir molekül, iyon ya da bileşik serbest radikal olarak adlandırılır (45).

Serbest radikaller kimyasal sembollerinin üst tarafına konulan nokta ile gösterilirler. Örneğin $O_2^{\bullet -}$: süperoksit anyon radikali, OH^{\bullet} : hidroksil radikali (46). En basit serbest radikal sadece bir eşleşmemiş elektron içermesi nedeni ile hidrojen atomudur. Biyolojik moleküllerin çoğu eşleşmiş elektron içerdiğinden radikal değildir. Atomlar son elektron yörüngeleri doluyken ya da boşken kararlı yapılardır. En dış yörüngelerini tamamen doldurmak ya da boşaltmak amacıyla elektron alışverişi, paylaşımı yaparlar. Bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron varlığı nedeniyle genelde serbest radikaller oldukça reaktiftirler. Radikallerin kimyasal reaktiviteleri oldukça geniş bir spektrumda değişkenlik gösterir. Genellikle radikal olmayan maddelere göre daha reaktif olduklarından eşleşmemiş elektronlarını paylaşmak için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerek bu moleküllerden elektron alır ya da verirler. Bu şekilde kendi aralarında da etkileşime girebilirler. İki serbest radikalın birleşmesi sırasında eşleşmemiş elektronları da birleşerek bir çift

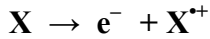
oluşturur. Böylece her iki radikal ortadan kalkar. Ancak organizmada bulunan moleküllerin çoğu eşleşmemiş elektron içermediğinden serbest radikaller çoğu zaman radikal olmayan maddelerle tepkimeye girerek yeni serbest radikaller oluşturur. Bu olaylar zincir tepkimeler olarak sürme eğilimindedir (44, 47).

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşmaktadır:

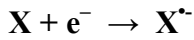
Bir molekülü oluşturan kovalent bağın hemolitik yarılmaması ve eşlenmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması sonucu:



Bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu:

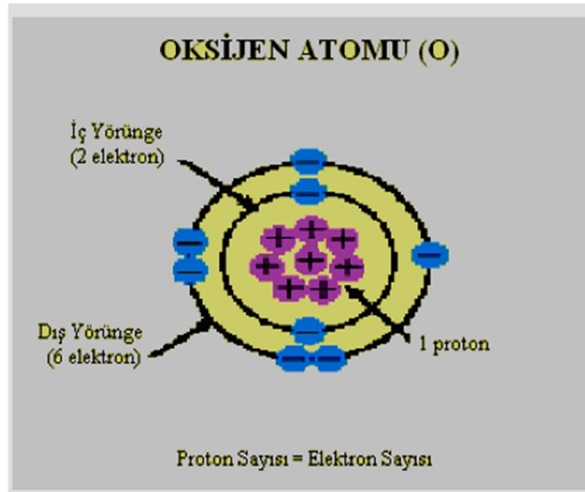


Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu: (48)



2.3.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen 8 atom numaralı doğada dioksijen (O₂) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısıyla ilişkilidir (Şekil 4),(Şekil 5), (49, 50).



Şekil 4: Oksijen atomlarının yapısı (51).



Şekil 5: Oksijen moleküllerinin yapısı (51).

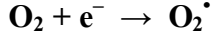
Oksijen molekülündeki aynı yöne dönen iki elektrona sahip 2p son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde “singlet oksijen” oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse “oksijen radikali” elde edilir. Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdan kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler. Bu özellikleri ile reaktif oksijen partikülleri radikaller ve radikal olmayanlar olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir (Çizelge I), (49, 50).

Çizelge I: Oksijen türevi bileşikler (48)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (HO)	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO)	Singlet Oksijen (O ₂)
Peroksil (ROO)	Ozon (O ₃)
Superoksit (O ₂)	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik oksit (NO)	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO ₂)	Peroksinitrit (ONOO)

2. 3. 1. 1. Süperoksit Radikalleri (O₂[•])

Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit radikali meydana gelir.



Mitokondrial elektron transport zinciri sırasında O₂'nin otooksidasyonu sonucu oluşur. Süperoksit radikali O₂ varlığında ksantin oksidazın ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle oluşabilmektedir. NADPH'nin NADPH oksidaz ile oksidasyonu, mitokondrial elektron transport sisteminde NADH₂ ve FADH₂'nin NAD ve flavin adenin dinükleotit (FAD)'ye dönüşümü sırasında, O₂'nin iyonize radyasyonla, sit p450 ile ve arginin veya tetrahydrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentazla indirgenmesiyle oluşur (52, 53).

Normal metabolizma sırasında sürekli olarak oluşan süperoksit radikalleri organizmada şu reaksiyonlara girebilir:

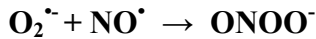
Süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz ile dismutasyona uğrayarak H₂O₂ oluşturabilir. İki süperoksit radikali birbiri ile etkileşerek biri yükseltgenirken diğeri indirgenmekte böylece H₂O₂ ve O₂ meydana gelmektedir.

Süperoksit radikalleri ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali (HO₂[•]) oluşturabilir. Perhidroksi radikali süperoksit radikalinden çok daha reaktiftir, örneğin membrandaki yağ asitlerinin peroksidasyonunu başlatabilir.

Süperoksit radikali ve H₂O₂ demir iyonu katalizörlüğünde OH[•] oluşturabilir ve bu tepkime de demir-katalizörlü Haber-Weiss reaksiyonu adını alır. Bu reaksiyonlar metal şelatörü ajanlarla inhibe edilebilir.

Süperoksit radikalleri enzimatik olmayan dismutasyon veya Haber-Weiss reaksiyonu sırasında singlet oksijen (¹O₂) yapımına neden olabilir. Singlet oksijen süperoksit toksisitesine aracılık edebilmektedir.

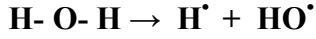
Süperoksit radikali nitrik oksit radikali (NO[•]) ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturabilir. Peroksinitrit çok daha reaktif ve sitotoksik bir türdür.



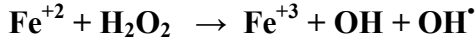
Süperoksit radikalleri, fenoksil radikalleri ile reaksiyona girebilir ve protein yapısında modifikasyona neden olabilir. Fenoksil radikali, fenollerin oksidasyonu sonucu oluşur, organizmadaki başlıca fenol kaynakları tirozin ve E vitamindir (54, 55).

2. 3. 1. 2. Hidroksil Radikali (OH[•])

Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, radyasyon enerjisinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorblanır ve radyasyon oksijen-hidrojen arasında kovalent bağın ayrılmasına neden olur. Sonuçta şekilde görüldüğü gibi iki radikal meydana gelir. Bu radikallerden biri hidrojen (H[•]) ve diğeri ise HO[•]'dir.

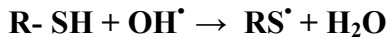


Hidrojen peroksidin Fe⁺² veya Cu⁺² ile reaksiyona girmesiyle de HO[•] oluşmaktadır. H₂O₂ toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde bu oluşan HO[•] olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiş ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.



Hidroksil radikalleri başta lipit, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücrel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. Hidroksil radikalleri DNA'da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine hidroksil radikalleri aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve ribonükleik asit (RNA)'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olurlar. Örneğin: Timine katılarak timin radikalini oluşturur ve bu radikal oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil radikaline dönüşmektedir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen hidroksil radikalleri DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olurlar. Hasar çok kapsamlı olursa hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir (56, 57).

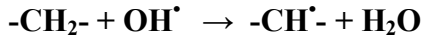
Deoksiribonükleik asitin pürin ve pirimidin bazları ile etkileşmenin yanı sıra tiol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu da koparabilmektedir.



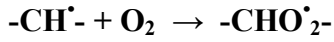
Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O₂ ile kombine olabilir ve oksisülfür radikallerini oluşturur. RSO₂[•] ve RSO[•] gibi bunların birçoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar.

Hidroksil radikalının sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipit peroksidasyon olayıdır. Hidroksil radikali membran fosfolipitlerinin doymamış yağ

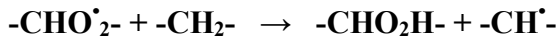
asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asit gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinden -C- atomunun birinden H atomunun çıkartılması ve su oluşumu şeklinde gerçekleşir.



Bu reaksiyon sonunda membranda -C- radikali kalır. Bu -C- radikali oksijen ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur.



Peroksil radikalleri reaktiftir ve yakınındaki doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerine saldırır;



Lipit hidroperoksit

Böylece hidroksil radikalleri, yüzlerce yağ asitlerinin yan zincirlerini lipit hidroperoksitlere dönüştürür. Membranda lipit hidroperoksitlerinin birikimi membran fonksiyonunu bozar. Peroksil radikaller ve sitotoksik aldehitler, membran proteinlerinde ciddi bir hasara neden olurlar ve membrana bağlı bazı enzimleri ve reseptörleri inaktive ederler (58-60).

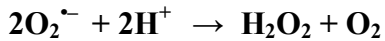
2. 3. 1. 3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya O₂^{••}'nin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek H₂O₂'yi meydana getirir (61).



Ancak, biyolojik sistemlerde H₂O₂'nin asıl üretimi O₂^{••}'nin dismutasyonu ile olmaktadır. Bu dismutasyon spontan olarak veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla katalizle olabilir:

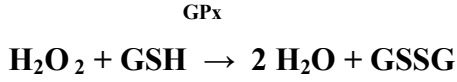
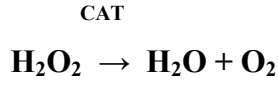
SOD



Hidrojen peroksit gerçekte bir serbest radikal türü olmamasına rağmen; serbest elektron içermesi, serbest hidroksil radikali oluşturabilmesi ve hücrel membranlara kolaylıkla girebilmesi nedeniyle önem kazanmaktadır. H₂O₂, geçiş metal iyonlarının varlığında kolayca parçalanarak en reaktif ve en toksik oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmaktadır. H₂O₂; OH[•] üretmek suretiyle canlı sistemlerde önemli hasarlara

sebebi olduğu için, H₂O₂ akümülyasyonunun kontrolü hücreler için biyolojik olarak önemlidir (61, 62).

Süperoksit dismutaz aktivitesi sonucu ortaya çıkan H₂O₂; katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GPx) enzimleri ile su ve oksijene dönüştürülür:



2. 3. 1. 4. Singlet O₂ (¹O₂)

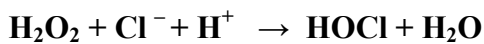
Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal değil ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet O₂, oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksidin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu tespit edilmiştir. Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle peroksil radikalleri (ROO), alkoksil radikalleri (RO) karbon merkezli radikaller (R) veya tiol radikalleri (RS) oluşur. Bu radikaller oksijenle tekrar reaksiyona girerek yeni serbest radikaller üretirler (63).

2. 3. 1. 5. Hidroperoksil Radikali (HO₂•)

Hidroperoksil radikali (HO₂•), süperoksit radikalinin protonlanmasıyla oluşur. Süperoksitten daha güçlü bir oksidandır. Biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesi önemlidir (63).

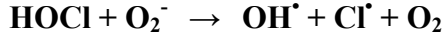
2. 3. 1. 6. Hipokloröz asit (HOCl)

Aktif nötrofillerde oluşan güçlü bir oksidandır. Nötrofil sitoplazmasında bulunan “hem” içeren bir enzim olan myeloperoksidaz etkisi ile H₂O₂ ve klorür iyonlarından HOCl oluşur (63).



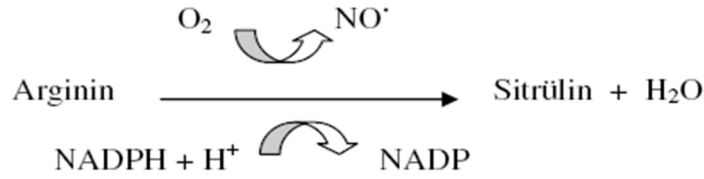
Hipokloröz asit Fe⁺² bağımlı ve Fe⁺² bağımsız bir reaksiyon ile hidroksil radikali oluşumunu arttırabilir.

Fe+2



2. 3. 1. 7. Nitrik Oksit (NO)

Memeli hücrelerinde NO başlıca NO-Sentaz (NOS)'ın aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS, oksijeni kullanarak L-arjinin amino asitinden sitrüllin ve NO'yu oluşturur. Bu olay, NADPH, flavin mononükleotit (FMN), flavin adenin dinükleotit (FAD), tetrahidrobiopterin (BH4) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar (64).



Yarılanma ömrü, moleküler oksijen ile hızlı reaksiyonundan dolayı atmosferik şartlar altında oldukça kısadır. Kan basıncı, guanilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Nötrofiller tarafından üretilen süperoksit anyon radikalinin oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (65). NO'nin aşırı üretimi toksik etkili olabilir. NO'nin kimyasal olarak aktivitesi yüksek değildir ancak belli şartlar altında oldukça toksik ürünler oluşturabilir. NO ve süperoksitin reaksiyona girmesiyle peroksinitrit meydana gelir. Peroksinitrit, direkt olarak proteinleri hasara uğratar ve OH[•], azot dioksit (NO₂[•]) ve nitronyum iyonu (NO₂⁺) gibi toksik ürünlere dönüşür (66).

2. 3. 2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında olduğu gibi çeşitli dış kaynaklı faktörlerin etkisiyle de oluşabilir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanısıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırırlar. Sitokrom P-450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stres yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, mitokondrial elektron transport sistemi (ETS), moleküler otooksidasyon yapan tiol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluştururlar (67, 68).

2. 3. 2. 1. Endojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları

2. 3. 2. 1. 1. Mitokondrial Elektron Transport Sistemi

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1–5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Fizyolojik olarak reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı normal oksijen metabolizmasıdır. Dolayısıyla fizyolojik koşullar altında mitokondrial elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır (69).

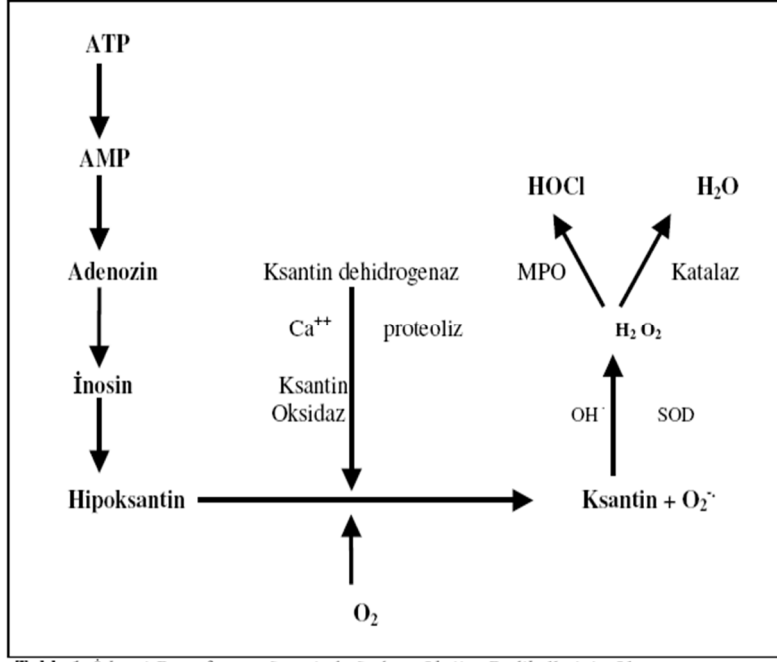
2. 3. 2. 1. 2. Araşidonik Asit Kaskatı

Araşidonik asit siklooksijenaz ve lipooksijenaz ile metabolize olarak prostoglandin, prostosiklin, tromboksan ve lökotrienleri içeren çeşitli vazoaktif ürünleri oluşturur. Siklooksijenaz, iki molekül oksijenin doymamış yağ asidine katılmasını katalizler ve prostoglandin G (PGG) oluşturur. PGG hızla prostoglandin H (PGH)' ye okside olur, bu sırada süperoksit radikali oluşur. Lipooksijenaz yoluyla da OH^{*} radikalleri oluşabilir (70, 71).

2. 3. 2. 1. 3. Ksantin Oksidaz (XO)

Ksantin oksidaz, memeli dokularında bulunan, birçok endojen ve eksojen kaynaklı substratın oksidasyonuna katılan bir enzimdir. Organizmada pürin bazlarının son oksidasyonu ve demirin gastrointestinal sistemden emiliminde rol oynar.

Bu enzim, sağlıklı hücrelerde oksidize nikotinamid dinükleotid (NAD⁺) bağımlı dehidrojenaz (XDH, D formu) halinde bulunur. Enzimin bu formu pürinlerin oksidasyonu sırasında elektron alıcısı olarak moleküler oksijen yerine NAD⁺ kullanır ve reaktif serbest oksijen radikali üretmez. İskemi sırasında XDH, oksidan üreten XO (D den O ya dönüşüm) formuna dönüşür (Şekil 6), (19).



Şekil 6: XD-XO'a dönüşümü ve serbest oksijen radikallerinin oluşumu (72).

İskemi sürecinde, hücre içindeki ATP, hipoksantin ve ksantine dönüşerek hücrenel enerji miktarında azalmaya neden olur. Hipoksantin ve ksantin, XO için iyi birer substrattırlar. Reperfüzyonun başlaması ile ortama katılan moleküler oksijen, iskemik süreçte birikmiş olan hipoksantin ve ksantin, XO aracılığı ile reaksiyona girerek, $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 açığa çıkarır.

XDH'dan XO'a dönüşüm 2 yolla gerçekleşir:

1. XDH'nın tiol gruplarının oksidasyonu ile geri dönüşümlü olarak.
2. İskemi sırasında artan hücre içi kalsiyum ile aktive olan proteaz ile enzimin bir kısmının proteolizi sonucu geri dönüşümsüz olarak.

İskeminin yol açtığı D den O ya dönüşüm farklı organlarda farklı hızlarda gerçekleşir. Bağırsak ve karaciğerde bu dönüşüm, çok kısa süreli iskemilerde bile olabilirken, iskelet kası ve deride daha uzun süreler gerektirir. Oluşan XO miktarı iskemi süresi ile doğru orantılıdır; iskemi süresi arttıkça oluşan XO miktarı da artar (73).

Ksantin oksidaz enziminin, meme epitel hücrelerinde kapiller endotel hücrelerinde yoğunlaştığı, kapiller endotel hücrelerindeki XO aktivitesinin aynı dokudaki diğer hücrelerden 100 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (74). XO'ın bu lokalizasyonu, iskemi-reperfüzyon hasarı için ayrı bir önem taşımaktadır.

Reperfüzyonun başlaması ile endotel hücreleri moleküler oksijen ile ilk temas eden hücreler olur. Bundan dolayı kapiller endotel hücreleri, reperfüzyon hasarından ilk etkilenen hücrelerdir. Bu neden ile serbest oksijen radikallerinin ana üretim merkezi

olmaları muhtemeldir. Kapiller endotel hücrelerinin hasarı bir kemotaktik stimulus halini alır (75).

2.3.2.1.4. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulumda buluna sitokrom P-450 moleküler oksijeni kullanarak birçok substratı oksitler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır. Kimyasal ajanların serbest radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur. Son durumda bir elektron eksikliği vardır ve elektrofilik bileşik oluşur. Oluşan bu elektrofilik ürün bir nükleofil ile reaksiyona girer. Bu elektrofilik bileşiği çeken en önemli bileşik sistein kalıntıları üzerindeki tiyol (-SH) grubudur. Tiyol grubu ise pek çok endojen makromolekülde (DNA, RNA, enzimler gibi) bulunduğu için reaktif ara ürünler bu moleküllerle kovalent bağlanarak toksisite gösterebilirler (48).

2.3.2.1.5. Peroksizom

Çok uzun zincirli yağ asitlerinin yıkılmasından sorumlu organeller olan peroksizomlar, amino asid oksidaz, urat oksidaz gibi oksidan enzimlerce zenginleştirir ve güçlü H₂O₂ kaynağı olarak kabul edilirler (76).

2.3.2.1.6. Plazma Membranı

Membranlarda bulunan doymamış yağ asitleri ve proteinler serbest radikal hasarına açıktır. Serbest radikallerin başlattığı lipit peroksidasyonu; transmembran iyon gradientinin bozulmasına, sekretuar fonksiyon kayıplarına ve hücrel metabolik olayların inhibisyonuna yol açar (76).

2.3.2.1.7. Otooksidasyon

Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinlerin oto oksidasyonu sonucunda radikal oluşabilir (77).

2. 3. 2. 1. 8. Redoks Döngüsü

Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Menadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin, gibi bileşikler alternatif bir redoks siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikalini oluştururlar (78). Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intrasellüler ferritin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan hidroksil radikali gibi ikincil radikallerin oluştuğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar (56).

2. 3. 2. 1. 9. Fagositoz

Radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmaları. Aktive fagositler intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar Aktive olmuş fagositlerde üretilen serbest radikaller patojenlerle savaşta önemli rol oynar (Çizelge II), (79).

Çizelge II: Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler

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

Kan monositleri, doku makrofajları (kupfer hücreleri, alveolar makrofajlar) gibi fagositik hücreler ve nötrofiller, eozinofiller, bazofiller gibi granülositler immunojenik veya özel bir uyarı ile uyarıldıktan sonra lizozomlarını dışarı vermeye başlarlar. Reaktif oksijen oluşumunun yanısıra, mitokondri dışındaki oksijen üretiminde bir patlama (respiratory burst) olur. Fagosite edilmiş, patojenler oksidan ajanlar tarafından öldürülür. Solunum yolu ile patlamanın amacı oksidan ajanlar sağlamaktır. Oluşan oksidan ajanlar patojenleri öldürmenin yanısıra myeloperoksidaz sistemine de etki eder. Hidrojen peroksit ve hipoklorit kombinasyonu myeloperoksidaz sistemini etkileyerek de güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterir. Bu radikaller memeli bakteri ve parazitlerine karşı

sitotoksik etkiye sahip oksidan ajanlardır. Membran peroksidasyonu, membran proteinlerinin dekarboksilasyonu ve/veya oksidasyonuna yol açıp membran bütünlüğünü bozabilir ve DNA'yı okside ederek parçalayabilir. Fagositik kaynaklı oksidan ajanlar; ototoksik, immunosupresif ve mutojenik etki oluşturabilirler (79).

2. 3. 2. 2. Eksojen Serbest Radikal oluşum mekanizması

Serbest radikaller, eksojen nedenlerle de oluşabilir. Radyasyon, sigara dumanı, zehirli gazlar, bazı ilaçlar, kanserojen maddeler ve pestisitler en önemli eksojen serbest radikal üretim kaynakları olarak bilinirler (80).

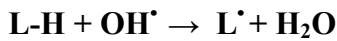
2. 3. 3. Serbest Radikallerin Etkileri

2. 3. 3. 1. Hücre içi etkileri

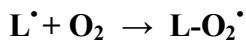
2. 3. 3. 1. 1. Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikal hasarının esas süreci lipit peroksidasyonu olarak kabul edilmektedir. SOR, özellikle hidroksil radikali pek çok organik bileşiğin doymamış bağlarına saldırarak etkisini göstermektedir. Biyolojik zarlar hücreleri ve hücre organellerini çevreleyen, lipit ve proteinlerden oluşan yapılardır. Çift tabaka fosfolipit arasına gömülü halde bulunan proteinler enzim, reseptör, taşıyıcı molekül olarak pek çok hücre işlevinde yer almaktadır. Biyolojik zarlar büyük miktarlarda yan bağlı çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içerirler ve serbest radikal hasarına karşı çok hassastırlar. Hücre zarının işlevlerini gerçekleştirebilmesi akışkanlığına bağlıdır. Akışkanlık ise büyük ölçüde PUFA varlığıyla sağlanmaktadır. PUFA'ların hasarında zarın akışkanlığının da azaldığı gösterilmiştir (45).

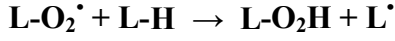
Zara yapışık poliansatüre yağ asitleri özellikle hidroksil radikali tarafından saldırıya uğrar ve yağ asidi yan zincirinden (L-H) bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile lipit peroksidasyonu başlar.



Böylece bir yağ asidi zinciri radikal (L[•]) özellik kazanır. Lipit radikallerinin moleküler oksijenle reaksiyona girmesi sonucu lipit peroksil radikali (L-O₂[•]) meydana gelir.



Lipit peroksil radikali çok reaktiftir, zar proteinleri ve zardaki komşu yağ asidi zincirleri ile reaksiyona girerek lipit peroksitlerini ve lipit radikalini oluşturur.



Oluşan serbest radikaller zincir reaksiyonu şeklinde yeni serbest radikaller oluştururlar (45).

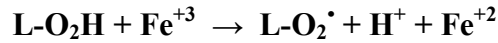
Lipit peroksidasyonunun başlaması ile olaylar; çoğu yağ molekülünün zarda oldukça hareketli bir planda bulunması ve zincirleme reaksiyonların başlangıç yönünde oluşan önemli değişiklikler nedeniyle geniş bir hal alabilir. Lipit peroksidasyonu zarın yapısında ve barındırdığı enzimlerde aşağıdaki hasarları oluşturur:

Zarın akışkanlığını değiştirerek iyon pompalarını ve reseptörlerin bağlanmasını etkileyebilir (81).

Zar lipitlerinin hidrolizi fosfolipaz A₂'i uyarabilir, bu da reseptör fonksiyonlarını etkiler (81).

Artan zar geçirgenliği nedeniyle kalsiyum homeostazisi değişebilir ve ATP azların kalsiyumu tutması azalabilir (81).

Sonunda plazma membranının bütünlüğünün kaybıyla hücre ölümü ve doku nekrozu gerçekleşebilmektedir. Zincirleme serbest radikal reaksiyonları sırasında ortamda demir ve bakır gibi metal iyonları bulunmadığında ortaya çıkan lipit hidroperoksit ve ürünleri oldukça kararlı bileşiklerdir. Metal iyonları ve onların kompleksleri lipit hidroperoksitleri parçalayarak lipit peroksidasyonu oluşturmaktadır (45).

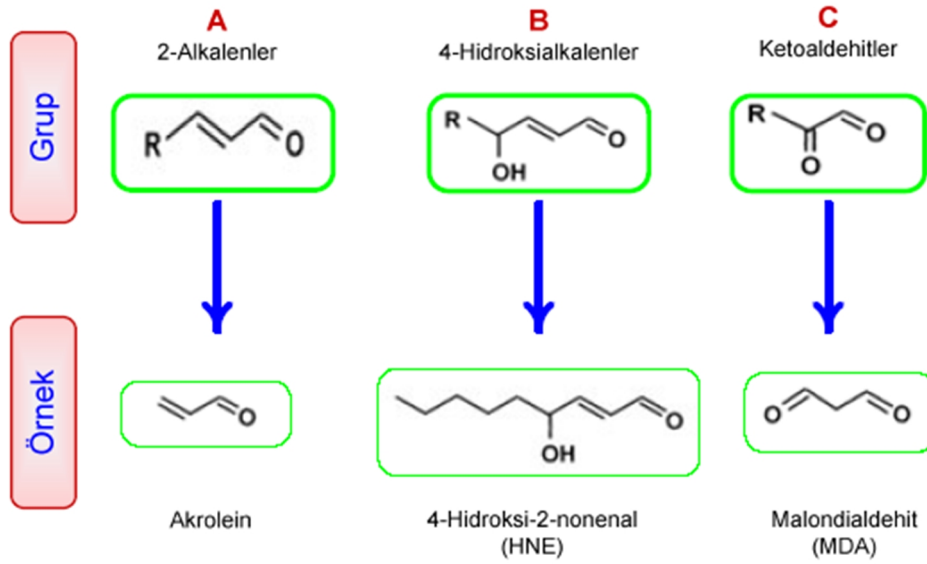


Lipit peroksidasyonu, lipit peroksitlerinin malondialdehit (MDA) ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona erer (81).

Malondialdehit ölçümü lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu bileşiğin miktarının saptanmasında tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin (TBARS) ölçümü yapılmaktadır. Bu oldukça nonspesifik olmasına rağmen MDA tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır (82).

Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehytler serbest radikallere göre daha stabildirler ve hücre içinde veya hücreden dışarıya çıkarak daha uzaktaki bölgelerdeki proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipitler ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilir. Bunun sonucunda molekül içi ve moleküller arası 1-amino-3-imino propen (AIP) köprüleri kurabilir ve biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlar oluşturabilir (Şekil 7), (83).

Üç karbonlu bir ketoaldehit olan MDA, normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra kreps siklusu ile CO₂'e indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipit peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir (84).



Şekil 7: Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehitler (83).

2.3.3.1.2. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin hücre çekirdeğinde ve DNA'da etkileri genotoksik ve mutajenik değişikliklere yol açar. DNA'nın nükleik asitleri ile reaksiyona giren serbest radikaller, DNA dizininde çatlaklar meydana getirerek bu hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine neden olurlar. Oksidatif DNA hasarı, büyük ölçüde yaşlanma ve kanser gelişimine katkıda bulunur (85, 86).

2.3.3.1.3. Proteinlere etkileri

Serbest radikallerin çift bağ ve tiyol içeren moleküllerle reaktivitesinin yüksek olmasından dolayı; triptofan, trozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein aminoasitleri serbest radikal hasarına duyarlıdır. Yapısında veya katalitik aktivitesinde bu aminoasitler yer alan enzimler radikal etkisi ile inhibe olurlar. Ayrıca radikal etkisi ile sitoplazmik ve membran proteinlerinde çapraz bağlanmalar ve agregat oluşumu görülür Normalde modifikasyonlara dirençli olan prolin, lizin gibi aminoasitler, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve OH^{\cdot} radikallerinin etkisi ile nonenzimatik olarak hidrosilasyona uğrayabilirler (87).

2.3.3.1.4. Karbonhidratlara etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 ve okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitler, DNA, ribonükleik asit ve proteinlere bağlanabilir ve çapraz bağ

oluşturabilirler. Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hyalüronik asidin serbest radikallerle etkileşerek bağ dokusunun durağanlığının bozulmasına ve sıvının akışkanlığının kaybına neden olur (87).

2. 3. 3. 2. Hücre Dışı Etkiler

2. 3. 3. 2. 1. Kemotaksi

Serbest radikaller, endotel hücrelerinden kemotaktik faktör ya da proinflamatuvar moleküller olarak adlandırılan histamin, platelet aktive edici faktör (PAF), lökotrein B4 (LTB4) salınımına yol açarlar. Bu kemotaktik faktörlerin etkisi, dolaşımdaki lökositlerin patoloji bölgesinde yoğunlaşmalarını ve endotel ile ilişkilerinin artmasını sağlamaktır (88).

2. 3. 3. 2. 2. Rolling

Normal koşullarda dolaşımdaki lökositler, damar endoteli ile nadiren temasta bulunurlar. Endotelin, İ/R ile oluşan radikaller tarafından uyarılması sonucu lökositler ve özellikle de nötrofiller, kendi etraflarında yuvarlanmaya başlarlar. Yuvarlanma olayını, aynı gruptan üç molekül yönlendirir. Bunlar lökositlerde bulunan L-selektin, endotel hücrelerinde yer alan P ve E selektindir. L-selektin, lökositlerin çoğunda bulunmakla beraber en yoğun olarak bulunduğu grup nötrofillerdir. L selektin, aktive olmamış nötrofillerin uyarılmış endotel hücrelerindeki P ve E selektinlerle birleşip ilk rolling olayının başlamasından sorumludur. L, P ve E selektinlerin etkileşimi sonucu lökositlerde yuvarlanma olayı gerçekleşir (30).

2. 3. 3. 2. 3. Adhezyon

Serbest radikaller, nötrofil ve endotel hücrelerinden selektin moleküllerinin yanı sıra adhezyon moleküllerinin de açığa çıkmasını sağlar. CD11/CD18, lökosit integrini olarak bilinir ve nötrofiller tarafından daha çok salınan, adhezyon yönlendiren bir moleküldür. Adhezyon olayı yalnızca lökositler arasında gerçekleşen bir olay değildir. Endotel hücrelerinin de bu olayda rolü büyüktür. ICAM-1, endotel hücreleri tarafından salınır ve lökosit integrini CD11/CD18'in karşılığıdır. ICAM-1'in salınımı, İ/R patogeneğinde iske mi sonrası nötrofil-endotel hücresi adhezyonunun moleküler düzeyde en önemli belirleyicisidir. CD11/CD18 ve ICAM-1'in reaksiyona girmesi, endotel hücresine yapışan nötrofillerden, iskemik dokuya direk radikal transferini hızlandırır. Bu geçiş,

kapiller düzeyde endotel hücrelerinin arasının açılarak damarın bariyer yapısını yitirmesine, oluşan aralıklardan nötrofillerin dokuya kaçması şeklinde gerçekleşir (27).

2. 3. 3. 2. 4. Antiadhezyon Molekülleri İnhibisyonu

Serbest oksijen radikalleri, NO'ı inhibe ederler. NO, kararsız bir nitrat bileşimidir. Damarlarda gevşemeye sebep olması, ilk tespit edilen fonksiyonu olmakla beraber organizmada birçok biyolojik olayda görev alır. Kas, deri, bağırsak ve kalp gibi birçok organ sisteminde var olduğu bilinmektedir. Endotel hücreleri, lökositler gibi pek çok hücreden salınabilir. NO, lökositin endotele adhezyonunu önleyen en önemli endojen moleküldür. Ancak NO salınımı, reperfüzyon hasarı sürecinde ortaya çıkan süperoksitin, endotel hücrelerine etkisi ile inhibe olur (89).

Adhezyondan sonra özellikle nötrofiller endotel hücrelerinin arasından diapedez ile dokuya geçerek burada birikirler ve aktif oksijen (respiratuvar patlama), proteolitik enzim ve inflamatuvar sitokinlerle doku hasarını başlatırlar (90).

2. 4. Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde, hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır. Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipitlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar lipit peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipitlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (91, 92).

Başlıca antioksidan etki çeşitleri şunlardır:

1. Reaktif oksijen türlerinin enzim reaksiyonları aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi,
2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi,

3. Metal iyonların bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,

4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.

Antioksidanlar; enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere başlıca iki grupta sınıflandırılabilir (Çizelge III).

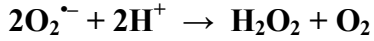
Çizelge III: Antioksidanların sınıflandırılması (93).

ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR					
1. Enzimatik Antioksidanlar	2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar				
<ul style="list-style-type: none">- Süperoksit Dismutaz (SOD)- Katalaz (CAT)- Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)- Glutasyon Redüktaz (GR)- Glutasyon-S-transferaz (GST)- Mitokondrial sitokrom oksidaz- Hidroperoksidaz	<table border="0"><thead><tr><th>I. Makromoleküller</th><th>II. Mikromoleküller</th></tr></thead><tbody><tr><td><ul style="list-style-type: none">- Seruloplazmin- Transferin- Ferritin- Hemoglobin- Miyoglobin</td><td><ul style="list-style-type: none">- Vitamin E- Vitamin C- Vitamin A- Tiyoil içerenler:<ul style="list-style-type: none">GlutasyonN-asetil sisteinMetiyoninKaptopril- Glukoz- Ürik asit- Bilirubin- Albumin- Ubiquinon- Melatonin- Selenyum- Lipoik asit</td></tr></tbody></table>	I. Makromoleküller	II. Mikromoleküller	<ul style="list-style-type: none">- Seruloplazmin- Transferin- Ferritin- Hemoglobin- Miyoglobin	<ul style="list-style-type: none">- Vitamin E- Vitamin C- Vitamin A- Tiyoil içerenler:<ul style="list-style-type: none">GlutasyonN-asetil sisteinMetiyoninKaptopril- Glukoz- Ürik asit- Bilirubin- Albumin- Ubiquinon- Melatonin- Selenyum- Lipoik asit
I. Makromoleküller	II. Mikromoleküller				
<ul style="list-style-type: none">- Seruloplazmin- Transferin- Ferritin- Hemoglobin- Miyoglobin	<ul style="list-style-type: none">- Vitamin E- Vitamin C- Vitamin A- Tiyoil içerenler:<ul style="list-style-type: none">GlutasyonN-asetil sisteinMetiyoninKaptopril- Glukoz- Ürik asit- Bilirubin- Albumin- Ubiquinon- Melatonin- Selenyum- Lipoik asit				
EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR					
<ul style="list-style-type: none">- Ksantin oksidaz inhibitörleri<ul style="list-style-type: none">AllopurinolOksipurinolFolik asit- NADPH oksidaz inhibitörleri<ul style="list-style-type: none">AdenozinLokal anesteziklerKalsiyum kanal blokörleriNon-steroid antiinflamatuvarlar- Nötrofil adezyon inhibitörleri- Soya fasulyesi inhibitörleri- Rekombinant human-SOD	<ul style="list-style-type: none">- Trolox-C- Endojen antioksidan aktiviteyi artıran mad.<ul style="list-style-type: none">Ebselen, Asetilsistein- Non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları<ul style="list-style-type: none">Mannitol, DMSO- Demir şelatörleri<ul style="list-style-type: none">DesferroksaminDimetiltiyöre- Sitokinler<ul style="list-style-type: none">TNF, İnterlökin-1- Barbitüratlar- Flavonoidler				

2. 4. 1. Enzimatik Antioksidanlar

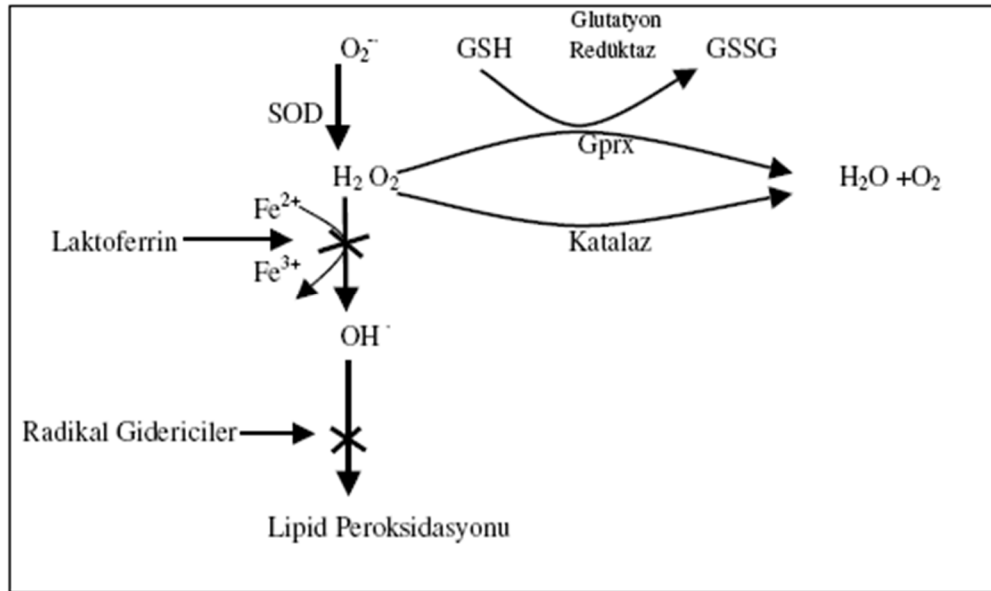
2. 4. 1. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD), bir metalloenzimdir. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur. SOD, McCord ve Fridovich (94) tarafından bulunmuştur ve süperoksitin hidrojen perokside dönüşümü reaksiyonunu katalizler.



Süperoksit dismutaz, bu reaksiyonda hem oksidan hemde redüktan olarak hareket eder. Oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı SOD, katalaz ve glutatyon enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır (Çizelge IV). Böylece oluşan hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından su ve oksijene indirgenmektedir. Peroksit radikalinin dismutasyonu ile oluşan H_2O_2 doku için biyolojik avantaj sağlar.

Çizelge IV: Antioksidan savunma mekanizması (95).



Süperoksit dismutazın bu reaksiyonu oksidatif strese karşı ilk savunma olarak da adlandırılır. Çünkü $\text{O}_2^{\cdot-}$, zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücresel kompartmanlardaki $\text{O}_2^{\cdot-}$ düzeyleri kontrol altında tutulur. Bütün canlılardaki SOD, kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre dört izoenzim halinde sınıflandırılabilir (96, 97).

1. Cu/Zn-SOD: Sitozolik SOD ve vasküler endotele bağı bulunan ekstrasellüler SOD'un kofaktörleri çinko ve bakırdır. Bu enzimlerin aktivitelerinden bakır, stabilitelelerinden çinko sorumludur.

2. Mn-SOD: Mitokondrial SOD'in kofaktörü mangandır.

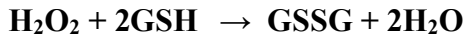
3. Fe-SOD: Bazı bakterilerde saptanmıştır.

4. Ni-SOD: Bazı bakterilerde bulunur. Aminoasit kompozisyonu diğer izoenzimlerden farklıdır.

İnsanlarda SOD enzimi: Sitozolik Cu/Zn-SOD; mitokondrial Mn-SOD; plazma, lenf ve sinovyal sıvılarda bulunan ekstrasellüler SOD olmak üzere 3 formda bulunur (96).

2. 4. 1. 2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

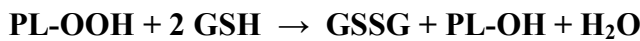
Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozolde yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir (96). Sitozolde yerleşik GPx aşağıdaki reaksiyonları katalizleyerek, hidrojen peroksidin ve organik hidroperoksitlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar:



Glutasyon peroksidazın iki substratı vardır. Substratlarından biri olan peroksitler alkole indirgenirken, diğer substrat olan GSH yükseltgenir. Oluşan yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği bir başka reaksiyon ile tekrar indirgenmiş (GSH) glutatyona dönüşür:



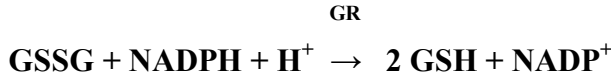
Yapısı ve fonksiyonları çok yakın zamanda aydınlatılabilmiş olan bir diğer GPx, "fosfolipit-hidroperoksit glutasyon peroksidaz" enzimidir. Bu enzim de selenyum içerir. Ancak monomerik yapıdadır. Zar yapısındaki fosfolipit hidroperoksitlerini, alkollere indirgeyerek, özellikle E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı korunma sağlar (98, 99).



2. 4. 1. 3. Glutasyon Redüktaz

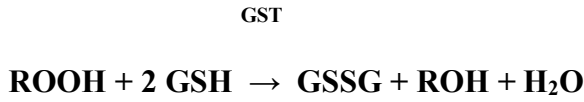
Glutasyon redüktaz, bir flavin enzimidir ve koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD'dır. Hem sitozol hem de mitokondride bulunmaktadır. Okside glutasyon hücreyi

antioksidanlara karşı koruyamaz. Hücre, elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanan glutatyon redüktazın katalizlediği bir reaksiyon ile indirgenmiş glutatyonu tekrar oluşturur. NADPH, hidrojen peroksidin indirgenmesinde indirekt olarak elektronları sağlar. Oluşan NAD⁺ ise Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz enzimi yardımıyla NADPH' a dönüştürülür (100).



2. 4. 1. 4. Glutatyon-S-Transferaz (GST)

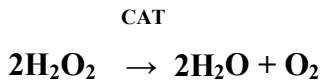
Glutatyon-S-transferazlar, hücrel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt birimden oluşan multifonksiyonel protein ailesidir. Genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılır. GST ailesi hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler, selenyumdan bağımsız GPx aktivitesi gösterirler (101).



Glutatyon-S-transferazlar, glutatyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlamaktadır (102).

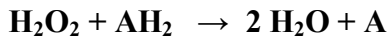
2. 4. 1. 5. Katalaz (CAT)

Katalaz 60 kDa ağırlığında 4 aynı yapıda tetrahedral subunitler içeren hem enzimidir. 240 kDa molekül ağırlığında her molekülde 4 adet ferriprotoporfirin içerir. Katalaz, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler (96).

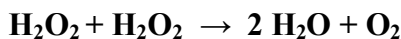


Katalaz, peroksizomlarda yerleşmiş olup kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır.

Katalaz düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğunda peroksidatif tepkime ile su oluşturur.



Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır (103).



2. 4. 2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

2. 4. 2. 1. E ve C vitamini

Yağda çözünen vitaminler içerisinde önemli yere sahip vitamin E, özellikle membran ve lipoproteinlerin bileşenleri üzerinde zincir kırıcı antioksidan etkiye sahiptir. Alfatokoferol vitamin E türevleri içerisinde en aktif bileşik olup, zincir reaksiyonları ile ilişkili peroksil radikalini temizleyerek lipit peroksidasyonunu engeller (104).

Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka bu moleküle antioksidan özellik kazandırır (105). Bununla birlikte alfatokoferol singlet oksijen, alkoksil radikali, peroksinitrit, nitrojen dioksit, ozon ve süperoksit radikalleri ile de tepkimeye girer. Lipit radikalleri ile tepkimesi sonucu oluşan alfatokoferol radikalının, peroksil radikale göre membranların yağ asidi zincirlerine karşı reaktivitesi çok düşük olup, askorbik asit başta olmak üzere diğer molekül veya mekanizmalar tarafından alfatokoferola dönüştürülür (106).

Askorbik asit veya vitamin C glikoz metabolizmasından gelen, suda çözünen vitaminler grubundandır. Prolin, lizin ve dopamin alfa hidroksilaz enzimlerinin kofaktörü olup, bu amino asitlerin hidroksilasyonunda ve kollojen fibrillerin sentezinde gereklidir. Askorbik asidin (Vitamin C) bir elektron oksidasyonu sonucu monodehidro askorbil radikali oluşurken, reaksiyona girdiği radikali de etkisiz hale getirerek serbest radikallerin organizmaya verdiği zararı engeller. Askorbik asidin radikalik formu ise glutasyon sistemi tarafından askorbik aside yeniden dönüştürülür (107).

2. 4. 2. 2. Karotenoidler

Karotenoidler (β -karoten, Likopen, Zeaksantin, Lutein, Violaksantin), genelde sarı ve turuncu renkli bileşikler olup bazı bakteriler ve alglerde, çoğu zaman ise bitkilerde bulunan pigmentlerdir. İnsan ve hayvanlar karotenoid biyosentezini gerçekleştiremedikleri için bu bileşikleri diyetle alırlar. Karotenoidler organizmada, triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama, singlet oksijeni baskılama ve bazı oksijen radikallerini temizleme gibi koruyucu etkilere sahiptir. Bununla birlikte karotenoidler, lipit membranlara lokalize olarak membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltır (108).

2. 4. 2. 3. Glutatyon (GSH)

Glutatyon, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptit olup antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. Organizmada temel olarak; peroksidaz aracılı peroksitlerin katabolize edilmesi, hücreyel tiyol ve redoks potansiyelinin düzenlenmesi, bir nörotransmitter veya immünofarmakolojik tiyol görevi üstlenerek endokrin ve immün sistem arasındaki interaksiyonu sağlaması, redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırarak strese cevabın aktivasyonu gibi görevler üstlenir (109, 110).

2. 4. 2. 4. Ürik asit (Ürat)

Ürik asit, ksantin oksidazın oksipürünleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi ile oluşur. İnsan ve gelişmiş primatlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Ürat, fizyolojik koşullarda singlet oksijen, hipoklorit ve hidroksil radikali gibi reaktif bileşikleri baskılar fakat süperoksit radikali ile doğrudan reaksiyona girmez, peroksit kaynaklı lipit peroksidasyonuna karşı korur, bu da ürik asidin antioksidan etkilerinin olduğunun göstergesidir (111).

2. 4. 2. 5. Melatonin

En zararlı radikallerden OH[•] ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik olmasıdır. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin engelini de kolayca geçer. Bu nedenlerle çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin çok yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımında bile toksik etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca, bazı antioksidanlar gibi pro-oksidan aktivitesi de yoktur. Deoksiribonükleik asit hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi azalır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde önemli olabileceği düşünülmektedir (112-114).

2. 4. 3. Total Antioksidan Kapasite (TAC)

Plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların toplam etkisini TAC (total antioksidan kapasite) yansıtır. Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu antioksidanların bir kısmının bir arada etki etmesi sonucu her birinin tek başına oluşturduğundan daha fazla antioksidan etki ortaya çıkar, yani aralarında sinerjistik etki vardır. Bu nedenle vücuttaki oksidan-antioksidan dengesinin belirlenmesi için tek tek

antioksidanların ölçümündense TAC ölçümü daha yararlıdır. Albümin, ürik asit ve askorbik asit, vitamin E, bilirubin TAC'a ana katkıyı oluşturan moleküllerdir (115, 116).

2. 4. 3. Total Oksidan Seviye (TOS)

Dışarıdan vücuda doğrudan alınabilen veya vücutta bazı reaksiyonlar sırasında açığa çıkabilen ve DNA'ya etki ederek genetik hasara, lipidlere etki ederek hücre membranlarında fonksiyon kaybına, proteinlere etki ederek ise enzimlerde fonksiyon kaybına yol açabilen radikallerden oluşur (117).

2. 4. 3. Total Serbest Sülfidril Grup (SH düzeyi)

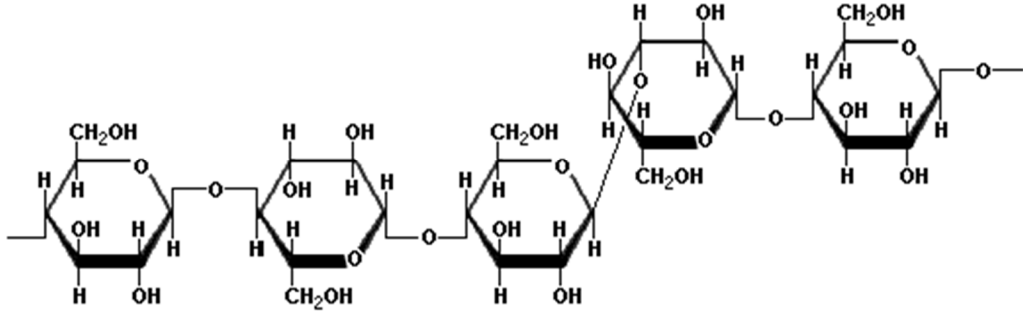
Serbest radikal saldırısının diğer bir hedefi, soluble ve proteine bağlı sülfidril gruplarıdır. Sülfidril içeren bileşikler, özellikle indirgenmiş glutatyon serbest radikal hasarına karşı hücreleri korumada önemli rol oynarlar. Proteinlerdeki sülfidril grupları redükte glutatyon tarafından redükte halde tutulur ve bu gruplar oksidasyondan korunmuş olur. Böylece fonksiyonel proteinler ve enzimlerin inaktivasyonu engellenir (118) .

2. 4. 3. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Total Antioksidan Kapasite (TAC)/Total Oksidatif Seviye (TOS) şeklinde bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplanır.

2. 5. Beta Glukan

β -glukan, mantarlarda, mayada ve kepekte bulunan dallanmış bir glikoz polimeridir. İmmün sistemin potent bir düzenleyicisi olarak aktivite gösterir. 1,3 / 1,6 glikozidik bağlı β -glukanlar (Şekil 8), biyolojik yanıt düzenleyicileri olarak, özellikle de immünomodülatör olarak aktivite gösterirler. İzole olan hücrelerle veya hayvanlarla yapılan çalışmalarda, β -glukan tarafından sağlanan immüno-sitümlasyonun kanser hücre büyümesini ve metastazı engellediği ve bakteriyel infeksiyonu indirgediği veya önlediği görülmüştür. İnsanlarla yapılan çalışmalar; β -glukan alımının, kan kolesterolünü düşürdüğünü ve vücut hücreleri tarafından glikoz kullanımını arttırdığını göstermiştir (119). β -glukanın biyolojik aktiviteleri doku tamirine ve dokunun yeniden oluşmasına yardım etmek ve inflamasyonu modüle etmektir (120).



Şekil 8. Beta-glukanın moleküler yapısı (121)

Besin olarak β -glukan; polisakkarit molekülünün 1,6- β -D-dallı kalıntıların bulunması nedeniyle, sindirime dirençlidir. Bununla birlikte, β -glukan için spesifik olan, hücrel reseptörler ve plazma bağlayıcı proteinler vardır (120). Mayalardan elde edilen preparasyonlar çok uzun zamandır kozmetik ve farmokolojik amaçlar için kullanılmaktadır (122). 1940'lı yıllardan bu yana glukanların fonksiyonel kullanım alanları üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (123). Yapılan çalışmalar yaygın olarak β -1,3 glukanların immünolojik ve farmokolojik etkileri üzerinedir (124). Son yıllarda glukanların faydalı etkileri immün fonksiyonların modülasyonu, antioksidant etkileri ve diğer nonspesifik etkilerine bağlanmaktadır (125). β -glukanların temel immüno-farmokolojik aktiviteleri; konakçının viral, bakteriyel fungal ve parazitik enfeksiyonlara karşı direncini artırması, antitümör etkisi ve karsinogenezden korunma, zararlı ışınların etkilerinden korunma ve immün sistemi güçlendirme, retiküloendotelyal sistemin fagositik ve proliferatif aktivitesinin artırılmasını kapsamaktadır. Bununla birlikte bütün glukanlar immün sistemi destekleme anlamında aynı veya kuvvetli değildir. Bu surette yulaftan, arpadan, çeşitli mantarlardan ve alglerden elde edilen glukanlar ekmek mayasından izole edilen β -glukan kadar kuvvetli bir immün sistem kuvvetlendirici değildir (126). β -glukan; immüno-stimülant olduğu kadar, immün sistemin potent bir düzenleyicisi olarak da aktivite gösterir. β -glukanın immüno-stimülatör aktiviteleri, kanser hücre büyümesi ve metastazın bozulmasıyla ve bakteriyel enfeksiyonun indirgenmesi ve önlenmesiyle sonuçlanabilir. β -glukanın immün sistem aktiviteleri, onun helikal konformasyonuna bağlıdır ve moleküler büyüklüğü de biyolojik aktivitelerini artırmak için gereklidir (120).

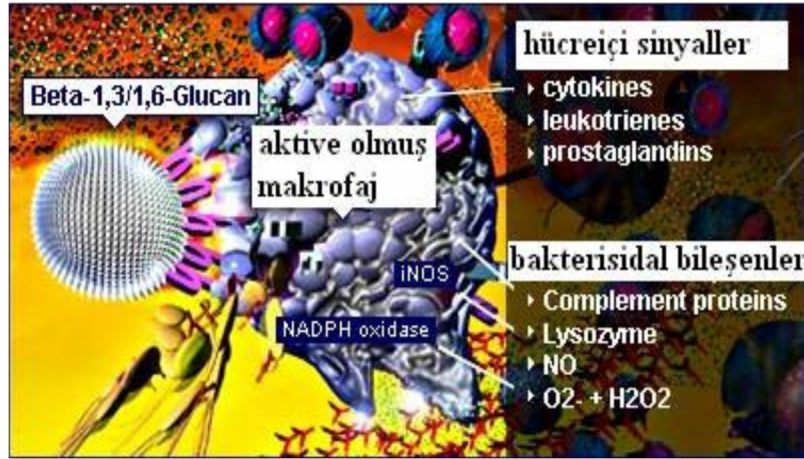
2.5.1. Beta Glukanın Biyolojik Aktiviteleri

2.5.1.1. İmmün Sistem Regülasyonu

β -glukanın en önemli biyolojik aktivitesi, immün sistemi düzenleme yeteneğidir. Çünkü onun diğer etkileri, bu aktivitesine bağlıdır. β -glukanın immünoregülatör aktiviteleri, immün sistem kontrolünde veya makrofaj fagositozunu ayarlama da yer alan sitokinlerin makrofajlardan salınımını uyarma veya engelleme yeteneğiyle ilişkilidir (120). Hayvanlarla yapılan çok sayıdaki çalışma, β -glukanın monositleri çektiğini ve sitokinlerin salınımı için makrofajlara bağlandığını ve makrofajları aktive ettiğini göstermiştir. Bunun yanında, sitokin üretimi üzerinde β -glukanın farklı etkileri, makrofajlar üzerinde *in vitro*, farelerde *in vivo* olarak araştırılmıştır ve β -glukan reseptörlerinin çapraz bağlanmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. 1,3/1,6 glikozidik bağlı β -glukanlar; biyolojik yanıt modifiyerleri olarak, güçlü immünomodülatör aktivite göstermiştir (120, 127). Fagositler (monositler, makrofajlar, granülositler) ve doğal öldürücü hücreler beta-1,3-bağlı glukanları tanıyan ve bağlanan yüzey reseptörlerine sahiptirler (Şekil 9). Bu reseptörler beta-glukan zincirlerinin spesifik yapılarına bağlanırlar ve beta glukanın bir immünostimülant olarak işlev görmesini sağlarlar. Bağlanan beta glukanın konsantrasyonuna bağlı olarak hücreler direk aktive olur veya bakteriyosidal bileşenlerin üretimine başlar ya da sekonder yanıtı artırmak için başlangıç (ilk) olurlar. Bir beta-glukan molekülü glukan reseptörü demetiyle karşılaştığında; lizozim, reaktif oksijen radikalleri ve nitrik oksit gibi bakterisidal bileşenleri üretirler ve hücreyi aktive ederler. Ayrıca hücre; kazanılmış (spesifik) immünitede yer alan fagosit ve lenfositleri aktive edecek olan birkaç sitokinin üretimini başlatır. Beta glukan; hem beta glukanla karşılaşan hücrelerin hem de yakın hücrelerin lokal aktivasyonunu uyaracak ve ayrıca beta glukanla karşılaşan hücrelerin bulunduğu yerlerden göç etmesi sonucu ve sitokinlerin salınımı nedeniyle de sistemik bir yanıtı uyaracaktır (Şekil 10).



Şekil 9. Makrofajlar, beta glukanları tanıyan ve onlara bağlanan reseptörlere sahiptirler (128).



Şekil 10. Makrofajlar beta-glukanların etkilerine aracılık ederler (128).

β -glukan tarafından sitokin salınımının immünoregülasyonu özellikle bakteriyel sepsise karşı yanıtı düzenlemede anlaşılmıştır. Örneğin; *in vitro*, rat alveolar makrofajları β -glukanla (>500 $\mu\text{g/ml}$) inkübe edildiğinde ve sonra bakteriyel lipopolisakkaritle karşı karşıya kaldığında, $\text{TNF-}\alpha$ salınımı baskılanır (129). Ayrıca, *in vivo* β -1,3/1,6 glukan enjekte edilen fareden izole edilen monositler ve lenfositlerin proinflamatuvar sitokinlerinin özellikle de $\text{TNF-}\alpha$ 'nın üretimini baskıladığı gözlemlendi (130).

Makrofaj fagositozu ile yapılan, hücre kültürü çalışmaları göstermiştir ki; fagositik sürece β -glukan reseptörleri aracılık eder ve bu süreç β -glukan tarafından inhibe edilebilir (131). Başka *in vitro* bir çalışmada, *C. albicans*'ın monosit fagositozu β -glukanla engellenmiştir (132). Bununla beraber, β -glukan fareye enjekte edildiğinde, β -glukan peritoneal makrofajların parçacıkları kavranmasını arttırmıştır. Bu da β -glukanın, doğal immün sistemin gereksinimine bağlı olarak, fagositik süreci ya engellediği ya da uyardığını desteklemektedir (133). Yara veya bir bakteriyel infeksiyonla savaş sırasında oluşan hücresel yıkıntılardan, dokuyu temizlemek gerektiğinde, β -glukanın fagositozu ve

proinflatör sitokinlerin salınımını uyarabildiği görülmüştür. Ayrıca, β -glukan ratlarda, inflamatör bir bölge için nötrofil ve makrofajların çekiciliğini uyardığı görülmüştür (134). Doku inflamasyonu daha şiddetli ise veya fagositoz daha fazla doku stresıyla sonuçlandığında bu süreç, yanıtın modülasyonu ile sonuçlanarak inhibe edilebilir. Örneğin; β -glukan in vitro fare hücrelerinde, inflamatör sitokinleri teşvik etmeksizin immünomodulatör aktivite göstermiştir (135).

2. 6. Morinda Citrifolia L.

Halk arasında Noni olarak bilinen Morinda citrifolia L. Polinezya, Tahiti ve Havai kökenli tropik bir meyve ağacıdır. Noni'nin Polinezya, Güney ve Güneydoğu Asya'da tıbbi bitki olarak kullanımının uzun bir geçmişi vardır. Yaklaşık bir patates büyüklüğünde ve oldukça sert kabuklu olan Noni meyvesi olgunlaştıkça acılaştıran, ağır bir peynir kokusuna sahip, 3-6 metre boylarında; karşılıklı dizilişli, 10-25 cm uzunluk ve 5-17 cm genişlikteki, sivri uçlu, belirgin damarlı, yumurtamsı, parlak yeşil yapraklarını dökmeyen, başçıklar oluşturarak beş taç yapraklı beyaz çiçekler açan bir ağaçtır (136).

'Yaşam Meyvesi' gibi tanımlamalarla anılan Noni, Batı dünyasının tarafından Birinci Dünya Savaşı sırasında keşfedilmiş, son yıllarda 50'den fazla bilim adamının araştırmalarına konu olmuş ve bu araştırmalar sonucunda da şaşırtıcı bulgular elde edilmiştir (136).

Fitokimyasal araştırmalar sonucunda Noni'nin yaklaşık 200 bileşiğe sahip olduğu ortaya konmuştur. Bunlar bir dizi antrakınonlar, antrakınon glikozitler, yağ asitleri ve bunların türevleri, iridoidler ve iridoid glikozitler, lignan, neolignanlar, flavonol glikozitler, fenilpropanoidler, sakaridler, triterpenoids ve yağlı asitleridir. Yağ asitlerinin tanımlanmasında ilk olarak gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GS-MS) kullanılırken, bu bileşiklerin çoğu Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ve kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır (137).

Noni aynı zamanda besin içeriği açısından değerlendirildiğinde yapraklarında A vitamini eksikliği tedavisi için potansiyel öneme sahip olan karotenoide rastlanmıştır (138). Başka bir çalışmada kuru ağırlığının her 100 gramında 158 mg C vitamini ve yaklaşık 2 gr potasyum içerdiği belirlenmiştir (139).

Son zamanlarda, Vietnam'dan toplanan noni meyvesinin polisakarit içeriği incelenmiştir. En bol monosakaritler arabinoz (Araf), galaktoz (Galp), galakturonik asit (GalAp) ve ramnozdur (RHAP). Polisakarit bileşimi ise daha çok pektik polisakaritler

olmak üzere homogalacturonan (% 49,5), tip I arabinogalaktan (% 12.3) ve rhamnogalacturonan I 'dir (10.8%) (140).

Polinezyalılar, bitkisel ilaçların farklı kombinasyonlarında Noni bitkisinin tamamından faydalanmışlardır. Meyve suyuna, arterit, diyabet, yüksek tansiyon, kas ağrı ve sızıları, adet güçlükleri, başağrıları, kalp hastalıkları, AIDS, kanser, gastrik ülser, eklem burkulması, depresyon, senilite, yetersiz sindirim, atheroskleroz, damar sorunları ve madde bağımlılığı gibi farklı hastalık türlerinde alternatif ilaç olarak yüksek oranda ihtiyaç duyulmaktadır. Noni meyve suyunun faydalarına yönelik bilimsel kanıtlar sınırlıdır fakat, soğuk algınlığı ve grip tedavilerindeki etkinliğine ilişkin bazı anektodal kanıtlar bulunmaktadır (141). Allen Noni'nin etnobotanikal özelliğine ait bazı veriler raporlamıştır. Meyvanın, müshil ve emmenagog olarak kullanıldığını belirtmiştir. Bu faktör Noni'nin ilaç olarak faydası üzerinde ilk makalelerden biridir (142).

Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki noni meyvesi tüketimi serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasarı azaltmıştır ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyonu ve kanser riski de azalmıştır (143, 144).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Deney Hayvanları ve modelin oluşturulması

Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (K.S.Ü) Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak K.S.Ü. Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvar'ında yapıldı. Çalışmamızın finansmanı K.S.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri fonundan sağlandı. Araştırma materyali olarak kullanılan 250–300 gr ağırlığında 4–5 aylık, toplam 40 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçan K.S.Ü. Deneysel Araştırma Laboratuvarından alındı. Sıçanlar 22–24 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlatma ve 12 saat karanlık periyodunda tutularak standart laboratuvar yemi verilerek beslendi.

Sıçanlar 5 gruba ayrıldı:

1- Sham grubu (n:5): Bir hafta süreyle normal şekilde sulanan ve standart yemle beslenen sıçanlardır. Deney gruplarında olduğu gibi karaciğerin orta ve sol lobunu besleyen hepatik arterler, portal ven ve safra yolu izole edilip klemp konularak iskemi-reperfüzyon süresi kadar bekletildikten sonra karaciğer doku örnekleri alınan gruptur.

2- İskemi-reperfüzyon (kontrol) grubu (n:5): Bir hafta sonunda hayvan anestezisi altına alınıp, karaciğer IRH oluşturularak karaciğer doku örnekleri alınan gruptur.

3- β-Glukan grubu (n:8): 10 gün boyunca yalnızca beta gluklan 50 mg/kg/gün dozda oragastrik gavaj ile beslenen ve deney sonunda hepatik İR hasarı oluşturularak karaciğer doku örnekleri alınan gruptur.

4- Morinda Citrifoli L. grubu (n:8): 10 gün boyunca yalnızca Morinda Citrifolia L. 4 ml/kg/gün dozda oragastrik gavaj ile beslenen ve deney sonunda hepatik İR hasarı oluşturularak karaciğer doku örnekleri alınan gruptur.

5- β-Glukan- Morinda Citrifoli L. grubu(kombine) (n:8): 10 gün boyunca 50 mg/kg/gün beta gluklan ve 4 ml/kg/gün Morinda Citrifolia L. oragastrik gavaj ile beslenen ve deney sonunda hepatik İR hasarı oluşturularak karaciğer doku örnekleri alınan gruptur.

Tespit edilecek operasyon sahası; Povidone İodine serub (MEDICA brush; %4 chlohexidine scrub, MEDICA BV, Hollanda) ile 10 dakika fırçalanarak %10 povidone iodine solusyonu (POVİOD; Saba Türkiye) ile dezenfekte edildi. Anestezisi için ise intraperitoneyal (İP) olarak 60 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) verilerek anestezisi sağlandı. Sıçanlara anestezisi uygulandıktan sonra, sırtüstü yatar pozisyonda karın polivinyl povidon ve steril gazlı bezle temizlendi. Orta hat insizyonuyla batına girilerek

vasküler klemple karaciğerin orta ve sol lobunu besleyen hepatik arterleri, portal ven ve safra yolu klempe edilerek 60 dakika iskemi gerçekleştirildi. Reperfüzyon'dan 60 dakika sonra histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler için karaciğer doku örnekleri alındı. Doku örnekleri alındıktan sonra tüm gruplardaki sıçanlar intraperitoneal yüksek doz anestezi madde verilerek sakrifiye edildi. Çalışma süresince bir mortalite meydana geldi.

3. 1. 1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Doku örnekleri, biyokimyasal değerlendirme yapılana kadar alüminyum folyo içinde laboratuara getirildi ve aynı gün homojenize edildi. Dokulara 1 gr doku 9 hacim (hacim/ağırlık) soğuk %1.15 M KCl eklendi. Dokular 16.000 devir/dakika hızda 1 dakika süreyle homojenize edildi. Enzim aktivite kaybı olmaması için kar dolu küvete homojenize edilen cam tüpler yerleştirildi. Daha sonra homojenatlar 14.000 xrpm' de +4 °C 45 dakika santrifüj edilerek süpernatantları ependorflara ayrıldı. Bu ayrılan süpernatantlardan Malondialdehit (MDA) ve protein düzeyleri ile Glutasyon peroksidaz (GPx), Süperoksit dismutaz (SOD), Total Antioksidan kapasite (TAC), Total Oksidatif Seviye (TOS), SH (total serbest sülfidril grup) aktivite ölçümleri ve Oksidatif Stres İndeksi(OSI) hesaplandı.

3. 2. Yöntemler

3. 2. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit ve moleküller oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XO) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (p-iyodonitrotetrazolium 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 ortamdaki uzaklaştırarak 2 numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır. Bu aradaki farkın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülür (145).

Ayırıcılar

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

50.00 mM CAPS

0.94 mM EDTA

Doymuş NaOH

2. Substrat karışımı

0.05 mM Ksantin

0.025 mM INT

Çözücü olarak CAPS tamponu kullanılır.

3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz

50 Ü Ksantin oksidaz

4. 0.01 M Fosfat tamponu pH 7.0

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

Standart Eğrinin Çizimi

Liofilize olarak hazırlanmış SOD standardı 10 ml bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla aşağıdaki tabloda verildiği şekilde hazırlanır. 2–8 °C'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

Çizelge V: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Kullanılacak Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	0.01 M Fosfat Tamponunun Hacmi	SOD Derişimi (Ü/ml)
S5	6 ml S6	5 ml	2.8
S4	5 ml S5	5 ml	1.4
S3	5 ml S4	5 ml	0.7
S2	3 ml S3	6 ml	0.23

S1: Kör (fosfat tamponu)

Yöntem

Süperoksit dismutaz aktivite tayini için, karaciğer dokularından hazırlanan süpernatant %30 ile %60 arasında % inhibisyon aralığı olacak şekilde 0,01 M fosfat tamponu ile 1: 65 oranında sulandırılır ve aktivite tayini yapılır.

Çizelge VI: SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

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

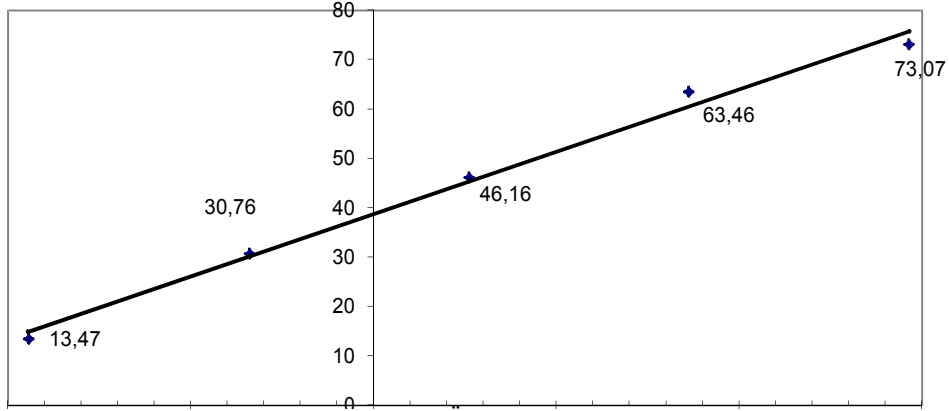
Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra çalışma körünün ve standardın 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı 3 dakika boyunca kinetik okuması yapıp ΔOD 'si okunur.

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 100'den çıkarılması sonucu hesaplanır.

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

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhisyon değeri yazdırılarak standart eğri elde edilir SOD standart eğrisi verilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11: Süperoksit dismutaz standart eğrisi

Örnek Çalışması

Çizelge VII: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
Doku örnek	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu	25	-
Substrat Karışımı	850	850
Küvetler iyice karıştırılır		
Ksantin oksidaz	125	125

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı 3 dakika boyunca kinetik okuması yapıp ΔOD 'si okunur.

Hesaplama

$$\% \text{ inhibisyon standart} = 100 - \frac{\Delta \lambda_{\text{çış}}}{\Delta \lambda_{\text{öü}}}$$

Örneğe ait hesaplanan yüzde inhibisyon değerine karşılık gelen SOD değeri standart eğri kullanarak bulunur. Ü/ml biriminden ölçülen SOD spesifik aktivitesi Ü/mg protein birimlerinden verilmiştir.

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

3. 2. 2. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini

Aerobik şartlarda pH 3.4'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90–95°C'de inkübasyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyonun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile

pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır; 532 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (146).

Ayırıcılar

1. %8,1'lik Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
2. %20'lik Asetik Asit (HAc) pH:3,5
3. %0,8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA)
4. n-Butanol/Piridin (nBu/Pri) Çözeltisi (14/1)
5. Stok Standart 1.1.3.3 tetramethoksiopropan (yoğunluk= 0.99 g/ml)

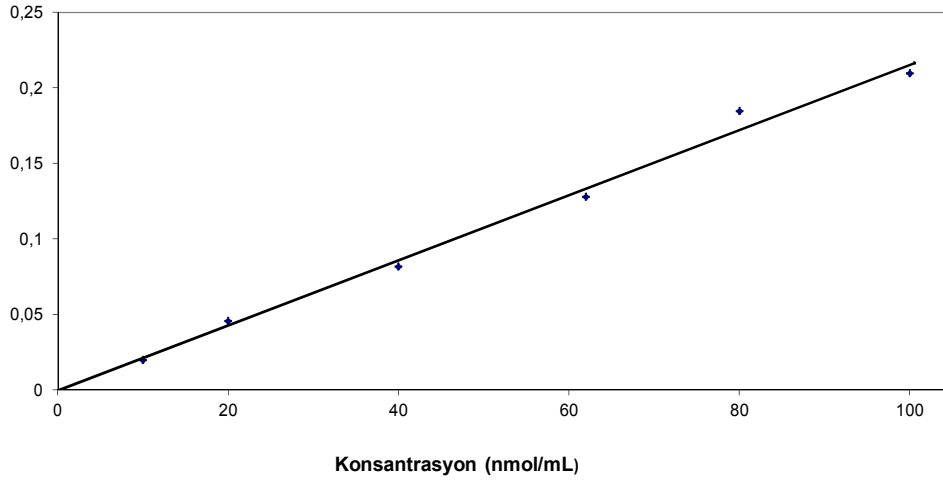
Standart Eğri Çizimi

Stok standarttan 6,6 µl alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart hazırlanır. 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/ml konsantrasyonunda çalışma standartları hazırlanır. Ayırıcılar tüplere aşağıda belirtildiği şekilde ilave edilir.

Çizelge VIII: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp No.	0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon(nmol/ml)	0	100	80	60	40	20	10
Standart (ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
%8.1 SDS (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
%20 HAc (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
%0.8 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
95 °C'de 30 dakika inkübe edilir, soğutulur							
Saf su (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
nBu/Pri (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

n-butanol/pridin ilavesinden sonra vorteks edilir. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üsteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbans okunur. Standart eğri grafiği çizilir. Şekil 12'de MDA standart eğrisi verilmiştir.



Şekil 12: Malondialdehit standart eğrisi

Yöntem

Örnek çalışması için yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan belirli hacimde doku örneği alınır ve MDA tayini yapılır. Örnek MDA tayini için aşağıda Tablo XI'de belirtildiği gibi tüplere ayırıcılar konur.

Çizelge IX: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Std (ml)	Örnek (ml)
Std (60 nmol/ml)	-	0.1	-
Örnek	-	-	0.1
SDS	0.2	0.2	0.2
Hac	1.5	1.5	1.5
TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.7	0.7
95 °C'de 30 dakika inkübe edilir, soğutulur			
Saf su	1.0	1.0	1.0
nBu/Pi	5.0	5.0	5.0

Çözeltiler vortekslenir. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım alınarak 532 nm'de absorbans okunur. Sonuç standart eğrisinden veya günlük standarttan değerlendirilir.

Hesaplama

nmol/ml biriminden 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. 2. 3. Protein Düzeyinin Tayini

Bu metotta proteinlerin içerdiği tirozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungstik-fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun 750 nm'deki absorbans ölçümüne dayanır (147).

Ayırıcılar

1. A Çözeltisi :

%2 Na₂CO₃

Çözücü olarak 0,1 N NaOH kullanılır.

2. B Çözeltisi

a) B₁ Çözeltisi:

%1 CuSO₄.

b) B₂ Çözeltisi

%2 Na-K tartarat

:

3. C Çözeltisi (Günlük hazırlanır)

50 ml A+1 ml B (0,5 ml B₁+ 0,5 ml B₂) karıştırılır.

4. D Çözeltisi (Günlük hazırlanır)

Folin Cioacalteu 1: 1,5 oranında saf su ile sulandırılır.

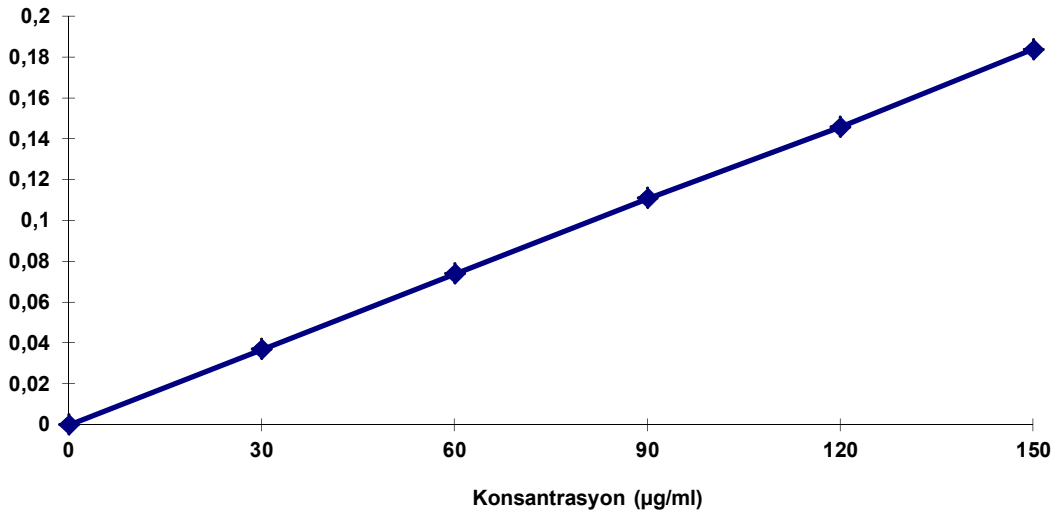
Standart Eğri Çizimi

Stok standart için 0,3 g/dl bovin albumin hazırlanır. Hazırlanan stok standarttan 5 ml alınıp 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlandığında 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 absorbanslar kaydedilir. Bu verilere göre konsantrasyon-absorbans eğrisi çizilir ve her numune ölçümünde standart eğri tekrarlanır. Şekil 13'te protein standart eğrisi verilmiştir.

Çizelge X: Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp no	Kör	1	2	3	4	5
Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	0	30	60	90	120	150
Standart bovin albumin (ml)	-	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Serum fizyolojik (ml)	0.3	-	-	-	-	-
C çözeltisi (ml)	3	3	3	3	3	3
15 dakika oda ısısında bekletilir						
D çözeltisi (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

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



Şekil 13: Protein standart eğrisi.

Örnek Çalışması

Karaciğer 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.

Çizelge XI: Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Serum fizyolojik	0.3	-	-
Standart	-	0.3	-
Süpernatant	-	-	0.3

C çözeltisi	3	3	3
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. 2. 4. Glutasyon Peroksidaz (GPx) aktivite tayini

GPx aktivitesi süpernatantta Beutler yöntemiyle saptanmıştır (148).

Ayırıklar

- 1M Tris-HCl pH 8.0 tampon,
- 0.1 M GSH (glutasyon),
- 10 U/ml GR (glutasyon redüktaz),
- 2mM NADPH (nikotinamid dinükleotid fosfat)
- 7 mM t-butil hidroperoksit

Çizelge XII: Doku örneğinde GPx tayini için tüplerin hazırlanışı

1M Tris-HCl pH 8.0 tampon	100µl
0.1 M GSH	20µl
10 U/ml GR	100µl
2mM NADPH	100µl
Örnek	10µl
Distile su	660µl

37°C de 10 dakika inkübe edilir.

İnkübasyon sonrası örnekler 1cm kuvars küvete konur üzerine 10µl 7 mM t-butil hidroperoksit konulduktan sonra okuma başlatılır. Tepkime, 37 °C de enzim tarafından oksitlenen 1µmol NADPH'ın 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1cm olan kuvars küvetlerde optik dansitedeki azalışı kinetik olarak 2,5 dakika süreyle okunur.

Hesaplama

$$\text{GPx Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0\text{ml})}{6,22 \times V_H (0,010 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Örnek hacmi

V_T : Toplam hacim

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

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

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

3.2.5. Total Antioksidan Kapasite (TAC) Düzeyinin Tayini

TAS ölçümü Total Antioxidant Status (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) kiti kullanılarak Aeroset 2.0 analizöründe yapıldı. Kullanılan bu kitte redükte ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) molekülü, asidik ortamda (asetat tamponu 30 mmol/l pH 3,6) hidrojen peroksit kullanılarak $\text{ABTS}^{\bullet+}$ haline okside edilir. Asetat tamponu içerisinde konsantre (koyu yeşil) ABTS^+ molekülü daha stabildir. Daha konsantre ve yüksek pH' a sahip asetat tamponu içinde (0.4 mol/l pH 5.8) dilüe edilme esnasında spontan şekilde koyu yeşil renk yavaşça kaybolur. Örnekte bulunan antioksidan konsantrasyonu oranında bu renk kaybı hızlanır. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak takip edilebilir ve ağarma hızı örnekteki TAC ile ters orantılıdır. Bu reaksiyon suda çözünen vitamin E analogu olan Trolox (6-hidroksi-2.5.7.8-tetramethylchroman-2-karboksilik asit) ile kalibre edilir. Ölçüm sonuçları mmol Trolox equivalent/L olarak ifade edilir (149).

3.2.7.Total oksidan status (TOS) düzeyi ölçüm yöntemi

Total oksidan status ölçümü Total Oxidant Status (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) kiti kullanılarak Aeroset 2.0 analizöründe yapıldı. Kullanılan bu kitte; Örnekte bulunan oksidanlar ferro iyon (Fe^{+2})-o-dianisidine kompleksini ferrik iyon (Fe^{+3}) haline getirir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bolca bulunan gliserol molekülleri ile güçlendirilir. Ferrik iyon xylenol orange ile asidik ortamda renkli bileşik oluşturur. Renk

yoğunluğu örnekte bulunan oksidan moleküllerinin miktarı ile ilişkilidir. Ölçüm hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kalibre edilir. Sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit equivalent olarak ifade edilir ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ Equiv./L}$) (150).

3.2.8. Total Serbest Sülfidril Grup (SH) Düzeyinin Tayini

Total serbest sülfidril grup Rel Assay Diagnostic, Türkiye kiti kullanılarak Aeroset 2.0 analizöründe yapıldı.

3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Tüm sıçanların karaciğerleri çıkarıldı. Organlar %10'luk tamponlanmış nötral formaline konuldu. Bir gün sonra da rutin histolojik takibe alındı. Elde edilen kesitler Hematoksilen- Eosin boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında incelendi. Karaciğer parankiminde, hidropik şişme, granüler dejenerasyon, mikroveziküler vakuolizasyon, fokal nekroz, kordon düzensizliği, portal alanda ise inflamasyon, fibrozis ve sinüzoidlerde ise hiperemi irdelendi. Tüm bu ölçütler Suzuki ve arkadaşlarının 1993'te tanımladıkları patolojik skorlama sistemine göre değerlendirildi (151).

Bu skorlama sistemine göre hasar;

0: Hiç yok

1: Minimal derece

2: İlmli derece

3: Orta derece

4: Şiddetli derecede

3. 4. İstatistik

İstatistiksel analizlerin değerlendirilmesinde bilgisayar programı olarak SPSS for Windows istatistik programının Release 15.0 sürümü (SPSS Inc USA) kullanıldı. Sonuçlarımız ortalama \pm standart sapma şeklinde verildi. Biyokimyasal verilerimizin değerlendirilmesinde gruplar arasındaki farkların incelenmesi için Non Parametrik Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Her iki test içinde $p < 0,05$ değeri ististik olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4. 1. Biyokimyasal analiz sonuçları

Kruskal-Wallis testi sonucuna göre gruplar arasında MDA, SOD, TAC, TOS ve OSI(TAC/TOS) değerleri arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$) (Çizelge XIII-Şekil 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)

Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre ise;

1) Sham grubu ile kontrol (İ/R) grubu karşılaştırıldığında; İ/R grubunda doku MDA ve TOS düzeyi arttı. Bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). SOD enzim aktivitesi ve GPx enzim aktivitesi sham grubuna göre yükseldi. Fakat istatistiksel anlamlı değildi ($p>0,05$). SH ve TAC sham grubuna göre düşük bulundu. SH düzeyindeki azalma anlamlı değilken TAC düzeyindeki azalma anlamlı idi ($p<0,05$). OSI sham grubuna göre düşük bulundu ve istatistiksel anlamlı değildi ($p>0,05$). (Çizelge XIII-Şekil 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)

2) İ/R grubu ile ilaç verilen İ/R grupları karşılaştırıldığında,

Beta glukon grubunda kontrole göre MDA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0,05$). TOS düzeyindeki artış anlamlı değildi ($p>0,05$). SOD ve GPx enzim aktiviteleri ile SH düzeylerinde ise artış gözlemlendi ancak bunlardan yalnızca SOD aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Kontrol grubuna göre TAC düzeyinde saptanan azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). OSI iki grupta da aynıydı ($p=1,000$). (Çizelge XIII-Şekil 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)

Morinda Citrifolia L grubunda kontrole göre MDA ve TOS değerlerinde azalma; GPx ve SOD enzim aktivitesi ile SH düzeyleri ise artış söz konusudur. MDA ve TOS düzeylerindeki azalma ve SOD aktivitesi artışı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). TAC düzeyi kontrole göre düşük bulundu, ancak anlamlı değildi ($p>0,05$). OSI değeri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdi ($p<0,05$). (Çizelge XIII-Şekil 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)

Kombine ilaç grubunda, MDA düzeyindeki azalma anlamlı değildi ($p>0,05$). GPx ve SOD enzim aktivitesi ile SH düzeylerinde artış bulundu ancak anlamlı değildi ($p>0,05$). TAC değeri kontrole göre düşüktü ($p>0,05$). TOS değeri ise kontrole göre yüksekti ($p>0,05$). OSI değeri kombine grupta düşüktü ($p>0,05$). (Çizelge XIII-Şekil 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)

3) İlaç verilen üç grup aralarında Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırma yapıldığında Morinda Citrifolia L grubunda Beta Glukan grubuna göre SOD, GPx aktiviteleri ile TAC ve SH düzeylerinde artış olması söz konusu iken istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). MDA düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı değilken TOS düzeyi azalması istatistiksel olarak anlamlı farklı idi ($p<0,05$). OSI değeri anlamlı yüksekti ($p<0,05$). (Çizelge XIII-Şekil 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20)

Kombine grup ile Beta glukan grubu ve Morinda Citrifolia L. grubu Mann-Whitney U testine göre ikili karşılaşmalar yapıldığında kombine grupta MDA düzeyi artışı diğer iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı farklıdır ($p<0,05$). TOS düzeyi Beta Glukan gruba göre düşük fakat istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p>0,05$), Morinda Citrifolia L. grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0,05$). SOD enzim aktivitesi kombine grupta diğer gruplara göre düşüktü. İstatistiksel anlamlı değildi ($p>0,05$). GPx aktivitesi ve SH düzeyi Beta Glukan grubuna göre arttı fakat anlamlı değildi ($p>0,05$), Morinda Citrifolia L. grubuna göre azaldı fakat anlamlı değildi ($p>0,05$). TAC değeri kombine grupta yüksekti fakat anlamlı değildi ($p>0,05$). OSI değeri kombine grupta düşüktü Morinda Citrifolia L. grubundan anlamlı farklı ($p<0,05$) iken Beta Glukan grubundan anlamlı farklı değildi ($p>0,05$) (Çizelge XIII-Şekil 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

Çizelge XIII. Deney gruplarında biyokimyasal parametreler (ort ± SS).

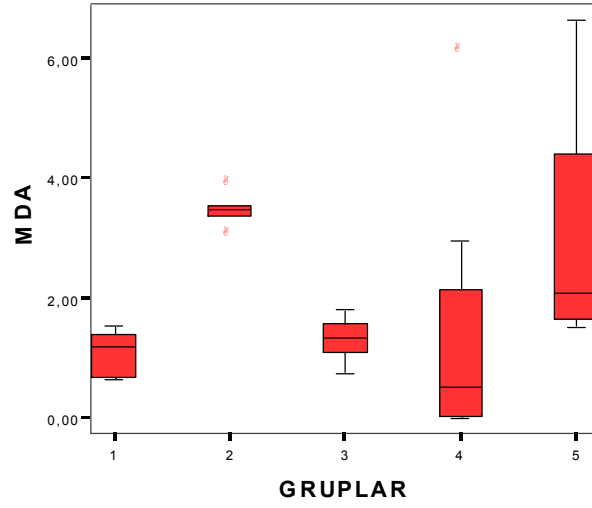
	Sham	İ/R (Kontrol)	Beta Glukan grubu	Morinda Citrifolia L. grubu	Beta glukan+Morinda Citrifolia L grubu
MDA (nmol/mg protein)	1,08 ± 0,41	3,45 ± 0,30*	1,32 ± 0,35 [#]	1,43 ± 2,13 [#]	3,19 ± 2,26* [▲]
SOD (U/mg protein)	10,71 ± 1,62	12,90 ± 1,89	23,44 ± 7,02* [#]	24,55 ± 10,70 * [#]	16,60 ± 11,86
GPx(U/mg protein)	0,68 ± 0,11	0,69 ± 0,17	0,74 ± 0,21	0,93 ± 0,19	0,86 ± 0,13
TAC (mmol/L)	3,51 ± 0,17	3,12 ± 0,15*	2,97 ± 0,31*	3,02 ± 0,31*	3,05 ± 0,16*
TOS (µmol/L)	2,20 ± 1,60	6,17 ± 1,93*	7,62 ± 1,49 *	3,69 ± 1,80* ^{#▲}	6,78 ± 1,80* [▲]
SH (µmol/ml)	1,63 ± 0,10	1,49 ± 0,12*	1,59 ± 0,23	1,84 ± 0,39	1,63 ± 0,25
OSI (TAC/TOS)	0,23 ± 0,72	0,16 ± 0,06	0,15 ± 0,08	0,26 ± 0,06 ^{#▲}	0,09 ± 0,06 * [▲]

* : Sham grubuna göre istatistiksel anlamlı fark var (p< 0.05)

: İ/R grubuna göre istatistiksel anlamlı fark var (p< 0.05)

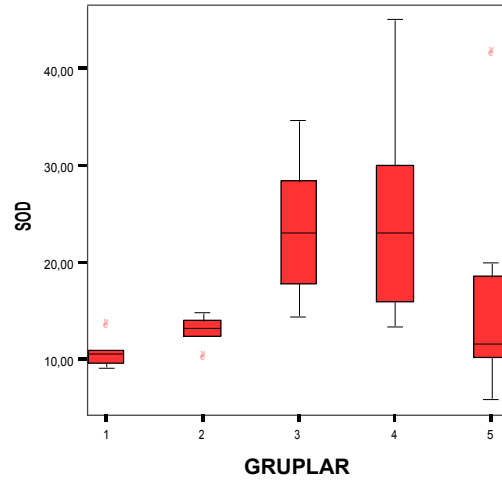
♠ : Beta glukan grubuna göre anlamlı fark var (p< 0.05)

▲ : Morinda Citrifolia L grubuna göre anlamlı fark var (p< 0.05)



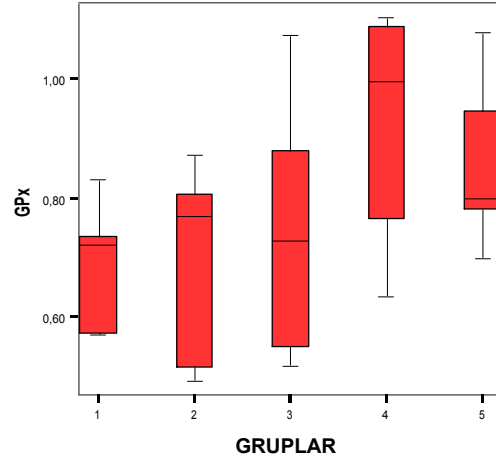
Şekil 14: Grupların MDA düzeyleri

(Grup 1: Sham, Grup 2: Kontrol, Grup 3: Beta Glukan, Grup 4: Morinda Citrifolia L., Grup 5: Beta glukan-Morinda Citrifolia L.)



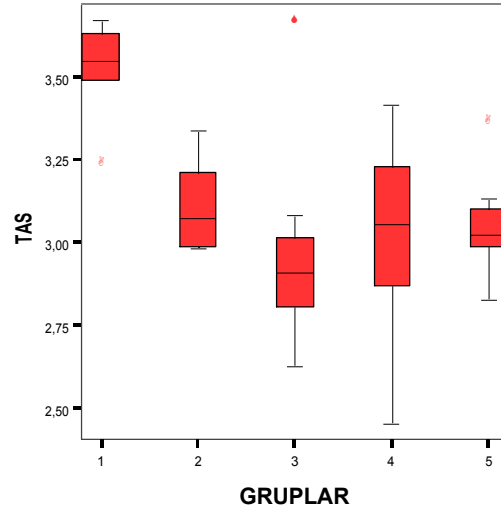
Şekil 15: Grupların SOD enzim aktivitesi

(Grup 1: Sham, Grup 2: Kontrol, Grup 3: Beta Glukan, Grup 4: Morinda Citrifolia L., Grup 5: Beta glukan-Morinda Citrifolia L.)



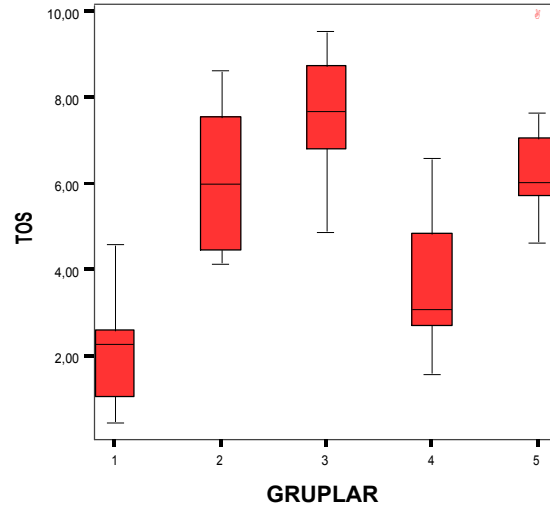
Şekil 16: Grupların GPx enzim aktivitesi

(Grup 1: Sham, Grup 2: Kontrol, Grup 3: Beta Glukan, Grup 4: Morinda Citrifolia L., Grup 5: Beta glukan-Morinda Citrifolia L.)



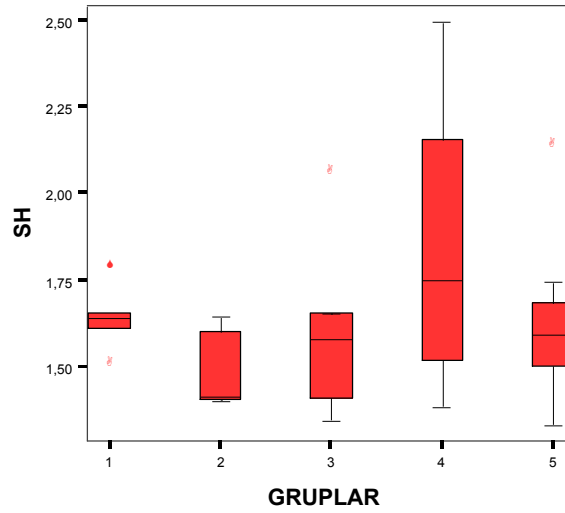
Şekil 17: Grupların TAC düzeyleri

(Grup 1: Sham, Grup 2: Kontrol, Grup 3: Beta Glukan, Grup 4: Morinda Citrifolia L., Grup 5: Beta glukan-Morinda Citrifolia L.)



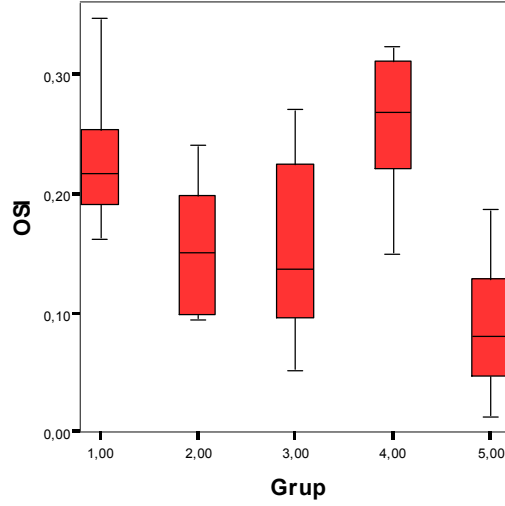
Şekil 18: Grupların TOS düzeyleri

(Grup 1: Sham, Grup 2: Kontrol, Grup 3: Beta Glukan, Grup 4: Morinda Citrifolia L., Grup 5: Beta glukan-Morinda Citrifolia L.)



Şekil 19: Grupların SH düzeyleri

(Grup 1: Sham, Grup 2: Kontrol, Grup 3: Beta Glukan, Grup 4: Morinda Citrifolia L., Grup 5: Beta glukan-Morinda Citrifolia L.)



Şekil 20: Grupların OSI düzeyleri

(Grup 1: Sham, Grup 2: Kontrol, Grup 3: Beta Glukan, Grup 4: Morinda Citrifolia L., Grup 5: Beta glukan-Morinda Citrifolia L.)

4.2. Histopatolojik analiz sonuçları

Kontrol grubunda bulunan sıçanlarda, sham grubundakilere göre karaciğerde oluşan hasar beklenildiği gibi histopatolojik parametrelerden kordon düzensizliği, fibrozis ve sinüzoidal hiperemiyi istatistiksel olarak anlamlı farkla karşılaşıldı ($p < 0,05$). Hidropik şişme ve mikroveziküler vakuolizasyon sham grubundakiler de dahil olmak üzere hiçbir hayvanda görülmediğinden gruplar arası bir farka rastlanmadı ($p = 1,000$) (Çizelge XIV- Şekil 21, 22, 23, 24, 25).

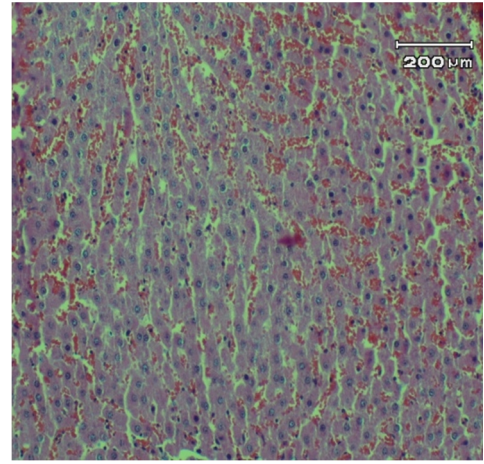
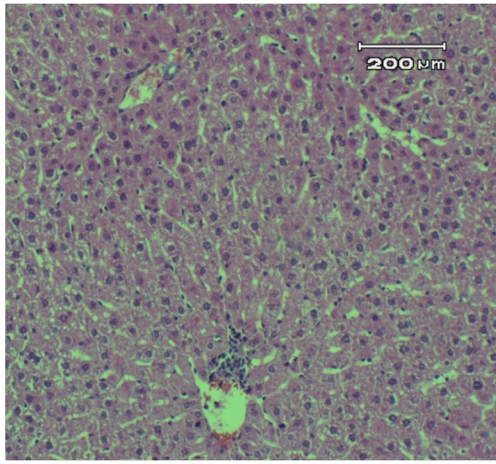
Kontrol grubu ile Beta Glukan grubu arasında; fokal nekroz, kordon düzensizliği, fibrozis ve sinüzoidal hiperemide istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu ($p < 0,05$) (Çizelge XIV- Şekil 21, 22, 23, 24, 25).

Kontrol grubu ile Morinda Citrifolia L. grubu karşılaştırıldığında fokal nekroz, kordon düzensizliği ve fibroziste anlamlı farklılık gözlemlendi ($p < 0,05$) (Çizelge XIV- Şekil 21, 22, 23, 24, 25).

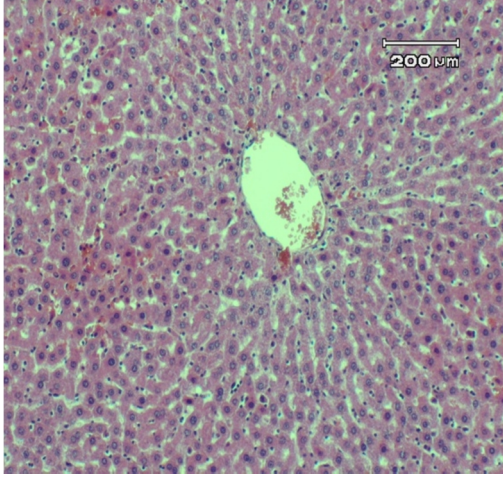
Kombine ilaç uygulanan grupta hem kontrol grubuna göre hem ilaç uygulanan gruplara göre histopatolojik yönden istatistiksel olarak anlamlı iyileşme söz konusu idi ($p < 0,05$) (Çizelge XIV- Şekil 21, 22, 23, 24, 25).

Çizelge XIV: Grupların histopatolojik analiz sonuçları

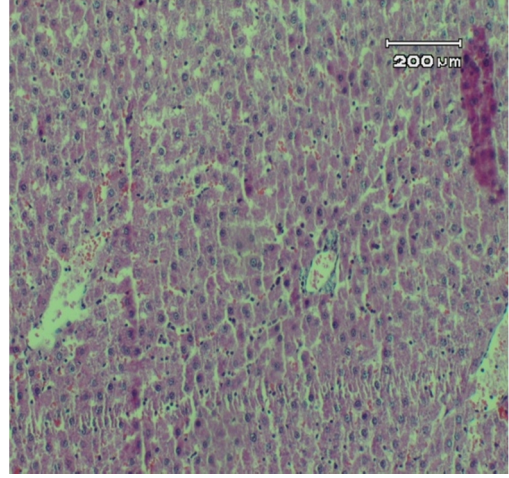
	Granüler dejenerasyon	Fokal nekroz	Kordon düzensizliği	Fibrozis	Sinüzoidal Hiperemi
Sham	2,60 ± 0,55	1,40 ± 0,89	0,20 ± 0,45	0,20 ± 0,45	1,80 ± 0,45
Kontrol	2,20 ± 1,09	2,20 ± 1,09	3,00 ± 0,00*	1,80 ± 1,09*	3,00 ± 0,00*
Beta glukon grubu	1,37 ± 0,52*	0,62 ± 0,52 [#]	1,00 ± 0,53 ^{*#}	0,62 ± 0,52 [#]	1,75 ± 1,03 [#]
Morinda Citrifolia L. grubu	1,62 ± 0,92	0,62 ± 0,92 [#]	0,87 ± 0,99 [#]	0,12 ± 0,35 ^{#♠}	1,87 ± 1,55
Beta glukon-Morinda Citrifolia L. grubu	0,57 ± 0,53 ^{*#♠Δ}	0,00 ± 0,00 ^{*#♠}	0,14 ± 0,38 ^{#♠}	0,14 ± 0,38 [#]	1,00 ± 0,00 ^{*#♠}
* : Sham grubuna göre istatistiksel anlamlı fark var (p< 0.05)					
# : kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı fark var (p< 0.05)					
♠ : Beta glukon grubuna göre anlamlı fark var (p< 0.05)					
Δ : Morinda Citrifolia L grubuna göre anlamlı fark var (p< 0.05)					



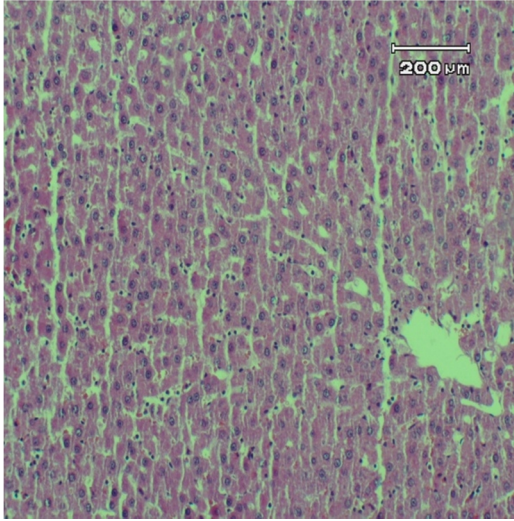
Şekil 21. Sham Grubu Hemotoksilen-Eozin(HE)x100 Şekil 22. Kontrol Grubu HEx100



Şekil 23. Beta Glukan Grubu HEx100



Şekil 24. Morinda Citrifolia L. Grubu HEx100



Şekil 25. Beta Glukan+Morinda Citrifolia L. Grubu HEx100

5. TARTIŞMA

İskemi reperfüzyon hasarı, hipoksik organın tekrar oksijenlenmesinden sonra ortaya çıkan hasarlanmadır. Bu hücresel hasarın derecesi, mortalite oranıyla doğru orantı göstermektedir. İskemik karaciğerde patolojik değişikliklerin meydana gelmesinde rol oynayan en etkili mekanizmalardan bir tanesi serbest radikaller ile ilişkili olanıdır. Özellikle İ/R esnasındaki hasardan SOR sorumlu tutulmaktadır. İskemi olayında, solunum zincirinde, sitokrom c oksidaz reaksiyonunda oksijen radikali ($O_2^{\cdot-}$) üretimi artar, ATP yıkımı artar. ATP yıkımının artmasına bağlı olarak adenozin metabolizması hızlanır, hipoksantin ve ksantin miktarı artar. XO enziminin artmasına bağlı olarak hücre içi oksijen radikali üretimi hızlanır. Anaerobik metabolizmadan dolayı hücre içi asidoz oluşur, bundan

zar yapıları zarar görür. Na-K ATP'az ve diğer taşıyıcı sistemler inhibe olur. Hücreye kalsiyum girişi artar, hücrenin zar yapısı bozulur. Bu durum kompleman faktörlerinin aktivasyonuna ve nötrofillerin zara adhezyonuna yol açarak radikal üretimini daha da hızlandırır. Reperfüzyon olayında ise, iskemi sonrası meydana gelen hiper-oksijenasyondan dolayı özellikle solunum zincirinin son reaksiyonunda oksijenin kısmi redüksiyonu hızlanarak, oksijen radikali üretimi önemli derecede artar. Ayrıca XO enzimi XO şekline dönerek hücre içi oksijen radikali üretimini artırır. İ/R olayında anlaşılacağı üzere serbest radikal metabolizması hasardan sorumlu önemli bir faktör olarak görülmektedir. Hücre içinde oluşan serbest radikal hasarına karşın enzimatik ve non-enzimatik savunma mekanizmaları mevcuttur. A, C ve E vitaminleri ile glutatyon nonenzimatik savunma mekanizmaları arasında önemli yer tutarken, SOD, GPx ve CAT enzimleri, hücre için enzimatik savunma mekanizmalarıdır (152).

Günümüzde gelişmiş tanı ve tedavi metodlarına rağmen, karaciğer iskemisinin morbidite ve mortalitesi yüksektir. Bu nedenle günümüzde önemini korumaktadır. Bu hasara yol açan mekanizmaların anlaşılması ve yeni tedavi modellerinin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. İskemik doku hasarından birçok faktör sorumlu tutulmasına rağmen, günümüzde serbest oksijen türevi radikalleri (O_2^* , OH^*), bu hasarın esas kaynağı olarak kabul edilmektedir. Hücre içinde oluşan oksijen türevi radikaller, iskeminin derecesine bağlı olarak çeşitli derecede hücre hasarına yol açmaktadır. Bu hasardan etkilenen yapılar ise hücre ve organellerin membranları, DNA ve enzimlerdir. İskemi olayında serbest radikallerin bu derecede önem kazanması, araştırmacıları değişik dokularda iskemi ve serbest radikal metabolizmasını araştıran çalışmalara yönlendirmiştir (152).

Organizmada SOR'nin zararlı etkilerini en aza indirmek amacıyla enzimatik ve non enzimatik savunma sistemleri bulunmaktadır. Normal şartlar altında SOD, GPx, CAT içeren enzimatik savunma sistemleri SOR'nin oluşturduğu oksidatif hasarı önlerler. Serbest radikal oluşum hızı bu radikalleri etkisizleştirme hızı ile aynı olduğu sürece oluşan radikallerden, organizma etkilenmemektedir. Buna karşılık antioksidan savunma azalır ya da zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulmakta ve SOR'lerine bağlı zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır. Antioksidan ajanlar birlikte kullanıldıkları zaman birbirlerinin etkilerini artırarak daha güçlü bir koruma sağlayabilecekleri gibi ortaya çıkabilecek yan etkilerde de azalma meydana getirebilirler (153).

Karaciğer iskemisi nakil cerrahisinden başka, travma, kanser, safra yolu tıkanmaları ve darlıkları nedeniyle ameliyat edilen hastalarda, ayrıca cerrahi girişim olmaksızın bir hemodinamik veya kardiyojenik şok periyodunu takiben oluşabilmektedir. Karaciğer İRH patofizyolojisi, karaciğer hasarına etki eden çeşitli düzeydeki birçok mekanizmanın katılımından meydana gelir. Kupffer hücre aktivasyonu, ROT oluşumu, sitokin ve kemokin salınımı, vazokonstrüksiyon, nitrik oksit ve endotelin dengesindeki bozulma, nötrofil lökositlerin toplanması, mitokondriyal geçirgenliğin değişikliğe uğraması, kalsiyumun hücre içine dengelenmemiş geçişi ve pH paradoksu gibi çeşitli hücre ve moleküler etkileşimler söz konusudur. Bu kompleks mekanizmalar hücre ölümüne, organ fonksiyon bozukluğuna ve en sonunda da organ kaybına neden olmaktadır. İRH'nin sorumlu olduğu düşünülen patofizyolojik mekanizmaları bloke edeceği düşünülen birçok hepatosit koruyucu ajan; allopurinol, roskovitin, α -tokoferol, mannitol, dopamin, prostoglandin, aktive karbon hemoperfüzyonu, glukagon, melatonin, karnitin, klorpromazin, aprotonin, metil prednizolon, deferoksamin, siklosporin, katalaz, aspartik asit, ubiquinon, trombosit aktive edici faktör antagonistleri, ATP, verapamil, nifedipin, süperoksit dismutaz tanımlanmış ve bunların İRH üzerine iyileştirici etkileri deneysel İR modellerinde araştırılmıştır (4, 5, 154, 155).

Biyokimyasal seviyedeki birçok çalışma ve hayvan deneyleri, yeniden oksijenasyonun zararlı oksijen radikallerinin fazla miktarda üretilmesine yol açtığını, bunun da doğal antioksidan savunma mekanizmasını tahrip ettiğini ve başta reperfüze olan organ olmak üzere tüm vücutta oksidatif yükü arttırdığını göstermiştir (156).

İskemi reperfüzyon hasarının önlenmesi için pek çok çalışma yapılmıştır. Serbest oksijen radikallerinin üretimini XO inhibisyonu yapan allopurinol ile önlenmesi, radikallerin ortamdaki temizlenmesi için vitamin E, C, SOD, resveratrol, karvedilol, Quersetin ve koenzim Q kullanılması ile İ/R hasarı azaltılabilmektedir (157).

Sıçanlarda hepatik İ/R modeli ve bu model sonucu ortaya çıkan hasarın değişik birçok ajanla önlenmesi amacıyla, in vivo olarak birtakım deneysel çalışmalar uygulanmıştır. Bu modellerde, karaciğerde iskemiyi yapmak amacıyla hepatic arterler, portal ven ve safra yolunun transeksiyonu ve oklüzyonu yapılmıştır. Bununla birlikte, uygulanan iskemiyi ve reperfüzyon süreleri noktasında, çalışmalar arasında farklılıklar bulunmaktadır.

Çekin ve ark. (158) sıçanların karaciğerinde 60 dakika iskemiyi ve iki saat reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında L-karnitini işlemiden önce dört gün boyunca vermişler ve deney sonunda L-karnitin İ/R hasarını önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir.

Bayramoğlu ve ark. (159) 45 dakika iskemi sonrası bir saatlik reperfüzyonun karaciğer hasarlanması için yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada da bu verilerden yola çıkarak hepatik İRH oluşumunun biyokimyasal ve histopatolojik olarak tespit edilmesi üzerine bir saat iskemi ve bir saatlik reperfüzyon planlandı ve deneysel model bu çerçevede kurgulandı. Çalışmada, hepatik iskemi reperfüzyon esnasında ortaya çıkan serbest radikallerden hücreyi korumada rol aldığı bilinen bazı enzimlerin aktiviteleri (SOD, GPx enzim düzeyi) ile TAC ve SH düzeyleri, oksidatif stres durumunu ortaya koyan TOS ile lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA miktarını tayin edildi. Ayrıca bu metabolizmalar üzerinde Beta Glukan ve Morinda Citrifolia L.'nin etkisini biyokimyasal ve histopatolojik yönden araştırıldı.

Serbest oksijen radikallerinin direkt ölçümü, bu maddelerin stabil olmamaları ve kısa olan yarı ömürleri nedeniyle mümkün olmamaktadır. Lipoperoksidasyonun sabit bir son ürünü olan MDA, hücre membranındaki lipidler üzerindeki serbest radikal etkisinin ölçülebilen kimyasal bir belirteçdir. Komplet ve inkomplet iskemi uygulanan deneysel modellerde yapılan bazı çalışmalarda, MDA'nın hücre duvarı ayrışmasının göstergesi olduğu ortaya konmuştur. Bu sebeple, MDA düzeylerinin ölçümü, İ/R olgularında serbest radikal aktivitesini tespit etmek için kullanılmaktadır. SOR aracılığı ile vücutta oluşan oksidan hasara karşı dokular, SOD, CAT ve GPx gibi birtakım radikal temizleyici enzimler taşırlar. Bu enzimler, H₂O₂ ve süperoksitleri temizler veya inaktive ederler. SOD, süperoksit radikallerini H₂O₂'e katalizler. H₂O₂ ise, CAT ve GPx tarafından moleküler oksijen ve suya indirgenir. GPx, glutatyon redüktaz aracılığı ile oluşan redükte glutatyonu okside forma dönüştürür. GPx, düşük H₂O₂ konsantrasyonunda daha etkindir. Bu bilgilerin ışığında, bu enzimlerin konsantrasyonlarının ölçümü, iskemi sonrasında oluşan SOR hakkında indirekt olarak bilgi verirler (160). Bu çalışmada da oksidan hasarın derecesini belirlemek ve kullanılan maddelerin bu hasarı önlemedeki başarısını saptamak amacıyla denek gruplarında oksidatif stres göstergesi MDA düzeyi, TOS düzeyi ve oksidatif strese karşı savunma cevabını gösteren SOD ve GPx enzim aktiviteleri ile TAC ve SH düzeylerini çalışıldı. Bununla birlikte oksidatif stres indexi de belirlendi.

Yapılan literatür araştırmasında karaciğer İ/R hasarının önlenmesinde Beta Glukan ve Morinda Citrifolia L.'nin etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Fakat yöntem ve uygulama olarak Beta Glukan'la ilgili başka organlarda yapılmış İ/R hasarı çalışmaları bulunmaktadır.

Gulmen S. ve ark. sıçan aortik İ/R hasarına Beta Glukan'ın etkisini araştırmışlar ve 120 dakika iskemi ve 120 dakika reperfüzyon yapmışlardır. İRH yaptıkları grupta MDA düzeyi ve SOD, CAT, MPO aktivitesinin yükseldiğini rapor etmişler, beta glukan verdikleri ilaç grubunda ise bu parametrelerin İRH yapılmış ilaçsız gruba göre ters bir şekilde azaldığını kaydetmişlerdir (161)

Bayrak O ve ark. böbrek İRH oluşturulan sıçanlarda bir antioksidan ajan olan Beta Glukan'ın etkilerini konu alan çalışmalarında Beta Glukan'ı oral olarak vermişler ve SOD ve GPx enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığını rapor etmişlerdir (162).

Morinda Citrifolia L ile ilgili Lin YL ve ark. Hipolipidemik ve antioksidatif etkilerinin olduğunu ispatlamışlardır (163).

Morinda Citrifolia L ile ilgili oksidatif stres üzerine literatürde yeterli yol gösterici araştırmaya rastlanmadı. Bu bilgiler ışığında antioksidan özelliği kanıtlanmış fakat hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde etkinliği araştırılmamış Beta Glukan ve çalışmada incelenen oksidatif stres belirteçleri ile ilgili yeterli bilgiye rastlanmayan Morinda Citrifolia L ile çalışıldı.

Sonuç olarak Beta glukanın ve Morinda Citrifolia L'nin oksidatif stres parametrelerine etkisi literatürle uyumlu bulundu. MDA ve TOS düzeyleri kontrole göre düşmüştü, SOD, GPx ve SH düzeyleri ise yükselmişti ve bu sonuçlar bizi hepatik İRH üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu kanısına vardırırdı. Beta glukan ve Morinda Citrifolia L kombine ilaç grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı herhangi bir fark yoktu ($P>0.05$). Kombine grubun Beta Glukan grubundan bir üstünlüğü olduğu bulunamadı. Fakat Morinda Citrifolia L'nin tıpkı Beta glukan gibi antioksidan etkisinin olduğu biyokimyasal ve histopatolojik açıdan ortaya kondu. Hatta Morinda Citrifolia L grubunda antioksidan enzim düzeyleri Beta Glukan grubuna göre daha yüksekti. Kombine ilaç tedavisinin etkisi diğer tedavilere göre daha üstün bulunamamıştır. Ancak geniş kapsamlı klinik araştırmalara ve bu maddelerin antioksidan etki mekanizmalarını gösterecek daha ayrıntılı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Oksidan belirteç olarak kullanılan TOS sonuçlarının kontrol grubumuzda sham grubuna göre değişiklik göstermemesi, kontrol grubumuzda oksidan yükün fazla olmadığını ve oksidan-antioksidan dengesinin yerinde olduğunu işaret etmektedir. Dolayısı ile oksidatif yükün aşırı olduğu durumda gelişebilecek kompensatuvar mekanizmalar ile antioksidan düzeylerinde artış veya oksidatif yük nedeniyle antioksidan tüketimine bağlı herhangi bir düşüş ortaya çıkmamış olabilir.

Buna karşılık organizmanın toplam antioksidan durumunu belirlemek için değerlendirilen TAC düzeylerinde beklenildiği gibi ilaç gruplarında yükselme gözlenemedi. Bu durum incelediğimiz antioksidan enzimler dışında diğer antioksidan cevabın yetersizliğine ve/veya oksidatif stresin aşırı artması karşısında tüketildiğini ve yetersiz hale geldiğini gösterebilir.

TAC düzeylerinde yükselmenin gözlenmemesine rağmen SOD enzim aktivitesinde anlamlı farklılık söz konusu idi. Ek olarak Oksidatif Stres Indexi değerlerinde ilaç gruplarında da yine anlamlı farklılık söz konusu idi.

Artan oksidatif stresle beraber plazma ve membranlarda bulunan SH grupları serbest radikal etkisi ile okside olmakta ve redükte formunda azalma tesbit edilebilmektedir. Bu bağlamda yaptığımız çalışmanın sonunda kontrol grubunda sham grubuna göre oksidatif strese bağlı SH grubunda anlamlı olmasa da azalma gözlendi. Oksidatif stresin artış düzeyi daha yüksek olsaydı anlamlı bir farklılık gözlenebilirdi.

Yapılan çalışmada histopatolojik yönden incelendiğinde kontrol grubu sham grubuna göre anlamlı farkla iskemi reperfüzyon hasarının olduğunu destekledi. İlaç uygulamalarında histopatolojik sonuçlar iyileşme olduğunu destekledi. Histopatolojik sonuçlara göre kombine grupta da iyileşme söz konusu idi. Fakat biyokimyasal değişiklikler histopatolojik değişikliklerden daha önce ortaya çıktığı için kombine grubun biyokimyasal açıdan herhangi bir üstünlüğünün olmadığı görüldü.

Çalışmamız deneysel açıdan bu maddelerin etkilerinin araştırılmaya değer olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Kontrol grubunda, sham grubuna kıyasla oksidatif stres göstergesi olan MDA düzeyi anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.05$). Oksidatif hasarı ortadan kaldırmaya çalışan antioksidan enzimlerden SOD yüksek bulunmuştur ($p>0.05$). Histopatolojik tabloda ise sham grubunda hasara rastlanmamıştır. Kontrol grubunda ise istatistiksel olarak histopatolojik tablo anlamlı hasar bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum, uyguladığımız modelin hepatik iskemi reperfüzyon hasarı oluşturmak için yeterli olduğunu göstermektedir.

Hepatik iskemi reperfüzyon sonrası oluşan oksidatif hasarı önlemede, Beta glukan'ın ve Morinda Citrifolia L'nin etkili olduğunu tespit ettik. MDA düzeyi ve TOS

anlamli olarak dūřmūřtūr (p<0.05). Antioksidan enzimler (SOD, GPx) anlamli yūkselme saęlamıřtır (p<0.05). Bu sebeple antioksidan etki gōstermiřtir.

Kombine ilaē uygulamasının oksidan hasarı önlemede tekli ilaē uygulamasından ūstūnlūęi yoktur.

7. KAYNAKLAR

1. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Journal of Pathology*. 190: 255–266 (2000)
2. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *American Journal of Surgery*. 129:513–517 (1975).
3. Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. *Journal of Hepatology*. 32: 39–47 (2000).
4. Tredger JM. Ischemia-reperfusion injury of the liver: Treatment in theory and practice. *Biofactors* 8 (1-2) :161-164 (1998).
5. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 18:891–902 (2003).
6. Akramiene D, Kondrotas A, Didziapetriene J, Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)* 43:597-606 (2007).
7. Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal beta-(1-->3), (1-->6)-glucans. *Mycol Res* 111:635-52 (2007).
8. Rice PJ, Adams EL, Ozment-Skelton T, Gonzalez AJ, Goldman MP, Lockhart BE, et al. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. *J Pharmacol Exp Ther* 314:1079-86 (2005).
9. Whistler WA. Traditional and herbal medicine in the Cook Islands. *J Ethnopharm* 13: 239-80 (1985).
10. Bruggnecate JT. Native plants can heal your wounds. *Honolulu Star-Bulletin Local News* (1992).
11. Heinicke R. The pharmacologically active ingredient of Noni. *Bulletin of the National Tropical Botanical Garden*, (1985).
12. Wang MY et al / *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research, *Acta Pharmacol Sin* 23 (1 2): 1127 -1141(2002).
13. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury. A review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004; 24: 468–475.
14. Akkoç H. Ischemia-Reperfusion-Induced Injury of Myocardium. *Dicle Tıp Dergisi* 2008; 35(3); 211–215.
15. İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. Part 1 Biochemical mechanism *Norol Bil D*. 2000; 17: 2.
16. Mathes SJ, Nahai F. *Reconstructive Surgery. Principles, Anatomy and Technique* Volume 1. 1997; 39–46.
17. Morin D, Hauet T, Spedding M, et. al. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 49(1–2); 151–174.
18. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*. 1991; 161: 488–502.
19. Mc Cord. Oxygen-derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. P.159–163. Ed. F. H. Epstein. In (Mechanism of disease), *The New England Journal of Medicine*. 1985; 17.
20. İşlek H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurol Sci*. 2000; 72: 1984–2000.
21. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, et. al. Pathophysiology of ischemia

- reperfusion Injury, central Role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1997; 78: 651–5.
22. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000; 32: 169–173.
23. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, et al. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine, *Transplantation.* 1993; 55: 1265–72.
24. Onishi I, Shimizu K, Tani T, et al. JNK activation and apoptosis during ischemia-reperfusion. *Transplant Proc.* 1999; 31: 1077–79.
25. Göğebakan Ö. Amrinon ve Sildenafil Sitratın Akut Mezenterik İskemi-Reperfüzyon Hasarında Bakteriyel Translokasyona Etkisi. Uzmanlık Tezi, Fırat üniversitesi Tıp Fak. Genel cerrahi A. D. Elazığ, 2006.
26. Belkin M, La Morte WL, et al. The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *J Vasc Surg.* 1989; 10: 14–18.
27. Horgan MJ, Ge M, et al. Role of ICAM–1 in neutrophil mediated vascular injury after occlusion and reperfusion. *Am J Physiol.* 1991; 259: L315-L319.
28. Lefter DJ, Scalia R, et al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest.* 1997; 4: 684–691.
29. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.* 1993; 26: 351–7.
30. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994; 84: 2068–2101.
31. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, et al. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke.* 1994; 25: 1847–54.
32. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, et al. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Bio.* 1998; 179: 169–187.
33. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1998; 254: H823- H827.
34. Schlag MG, Harris KA, Potter RF. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ phsiol.* 2001; 280(4): H1716-H1721. .
35. Charles D, Collard MD, Simon Gelman MD, et al. Pathophysiology, Clinical Manifestations and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology.* 2001; 94: 1133–8.
36. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, et al. Complement activation Following Oxidative stres. *Mol immunol.* 1999; 36: 941–8.
37. Harem MK. Mast hücre proteazları ve biyolojik önemi. *Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2005; 14(1): 61–67.
38. McNeil HP, Gotis-Graham I. Human mast cell subsets-distinct functions in inflammation. *Inflamm Res.* 2000; 49: 3–7.
39. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology Text & Atlas.* Tenth Edition. USA: McGraw-Hill Companies, 2003; 332-344.
40. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003; 18:891–902.
41. Lentsch AB, Atsushi K, Yoshidome H et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.*2000; 32:169–173.

42. Inglott FS, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Surgery* 2001; 181:160–161.
43. Chan K.L. Role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*. 2002; 1(1):1–13.
44. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*. 1997; 11: 118–124.
45. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Oxford University 1999.
46. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*. 1994; 91: 133–140.
47. Reiter RJ. Melatonin as an antioxidant. Biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol*. 2003; 50(4): 1129–46.
48. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 1991; 91: 14S–22S.
49. Meister A. Glutathione Ascorbate and cellcycle regulation. *FEBBS letters*. 1994; 1–4.
50. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J Mayo Clin Proc*. 1988; 63: 381–8.
51. <http://www.healthchecksyste.ms.com/antioxid.htm>.
52. Freidovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 893: 13.
53. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 899: 1.
54. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986; 246: 501–514.
55. Winterbourn C.C. and Kettle A.J. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 305: 729–736.
56. Dizdaroğlu M. *Mechanisms of Oxidative DNA Damage; Lesion and Their Measurement*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 1999; 302: 67–87.
57. Wetberg AB, Weitzman SA, Clark EP. Effects on antioxidants on antioxidant induce: sister chromatid Exchange formation. *J Clin Invest*. 1985; 75(6): 35–41.
58. Tappel AL, Dillard JC. In vivo lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *J Federation proceedings*. 1981; 40(3): 174–8.
59. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *J Biochem*. 1984; 222: 1–15.
60. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *J The lancet* June. 1984; 23(3): 1396–7.
61. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Konya Mimoza Yayınları*, 1. Baskı, 1995; 1–84.
62. Mccord JM. The evolution of free radicals and oxidative stres. *Am J Med*. 2000; 108: 652–659.
63. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J Clin Chem*. 1995; 42: 18–19.
64. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *TIBS*. 1997; 22: 477–481.
65. Utsumi K, Takehara Y, Inai Y, et al. Oxygen-dependent regulation of biological functions by nitric oxide. The mitochondrial production of oxygen radicals and cellular aging. *Understanding the process of aging ed. by/Cadenas E Packer L 15th. Ed. New York 1999; 60.*
66. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*. 1994; 344: 721–724.
67. Canbaş A. *Gıda Bil. Ve Teknolojisi. Ziraat Fakültesi Yayını No: 78 Ç.Ü. Adana*

1983. .

68. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide, Physiology, patophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun; 43(2): 109–42.
69. Sies H, De Groot H. Role of Reactive Oxygen Species in Toxicity. *J Toxicology.* 1992; 64 (65): 547–51.
70. Ikeda J. Lipid Peroxidation Products And Carcinogenesis, 1993; 76: 1235–1240.
71. Greenstock C.L. Radiation and aging: Free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med Hypotheses.* 1993; 41: 473–482.
72. Bishop ML, Janet LP. Free radicals in clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations. Third edition. Philadelphia New York 1996; 765–777.
73. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution, physiology. *Acta Physiol Scand (suppl).* 1986; 548: 87–99.
74. Jarasch ED, Bruder G, Heid HW. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand (suppl).* 1986; 548: 39–46.
75. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischaemia. *Am J Physiol.* 1988; 251: G567- G574.
76. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991; 161(4): 488–503.
77. Lorente L, Aller MA, Arias JL, et al. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg.* 1996; 83(7): 1010–1.
78. Mead J. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. Free radical in molecular biology. *J Aging and disease.* 1984; 65(24): 53–66.
79. Natarajan V. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. *J Clin Med.* 1995; 125(35): 26–37.
80. Ball S, Weindruch R, Walford L. Antioxidants and immun response. *J Free radicals Aging and Degenerative Diseases.* 1986; 427–456.
81. Van der Vliet A, Bast A. Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. *Chem Biol Interact.* 1992; 85: 95–116. .
82. Urso M.L, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003; 189: 41–54.
83. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases, *Free Radical Biology and Medicine.* 2000; 28: 1685–1696.
84. Uchida K. 4-Hydroxy-2-Nonenal: A product and mediator of oxidative stress, *Progr. Lip Res.* 2003; 569: 1–26.
85. Kaynak K. Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. *Solunum.* 2002; 4: 468–473.
86. Kolanjiappan K, Ramachandran C.R, Manoharan S. Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. *Clin Biochem.* 2003; 36: 61–65.
87. Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı. *Sendrom.* 2000; 9: 31–9.
88. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye klinikleri.* 1989; 1: 1–8.
89. Lefer DJ, Scalia R, et al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest.* 1997; 4: 684–691.
90. Most D, Hoyt J, et al. Parenchymal cytokine expression precedes clinically observed ischaemia in dorsal flaps in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 1996; 98: 856–861.
91. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim II.* 1998; 342–6.
92. Rangan U, Bulkley GB: Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull.* 1993; 49(3): 700–18.

93. Bulmuş G.F. Kronik hiperhomosisteinemi olusturulan ratlarda alfa-lipoik asidin plazma ve çeşitli dokularda oksidan antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bil. Enstitüsü Biyokimya A. D.Elazığ, 2006.
94. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244(22): 6049–55.
95. Karabiga M. Aprotinin'in Deneysel Aortik İskemi Reperfüzyon Modelinde Böbrek Hasarı Üzerine Etkisi. T. C. Süleyman Demirel Ü. Tıp Fak. Uzmanlık tezi, Isparta 2006. .
96. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience.* 1999; 4: 339–345.
97. Whittaker M, Whittaker JW. A glutamate bridge is essential for dimer stability and metal selectivity in manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1998; 273: 22188–22193.
98. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160(1): 1–40.
99. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol Cell Endocrinol.* baskıda 2006.
100. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70 (1): 158–69.
101. Shidhu P. Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactions.* 2004; 150: 199–209.
102. Liebert J, Matlawska I, Bylka W, et al. Protective effect of aquilegia vulgaris on APAP induced oxidative stress in rats. *J Ethnopharm.* 2005; 97: 351–358.
103. Sözmen E.Y. Yaşlanma Biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sözmen ET (editörler). İnsan Biyokimyası. 1.Baskı, Ankara 2002; 667–672.
104. Steinberg D. Is there a potential therapeutic role for vitamin E or other antioxidants in atherosclerosis? *Curr Opin Lipitol.* 2000 Dec; 116: 603–7.
105. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 1996; 16: 33–50.
106. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and it's function in membranes. *Prog Lipit Res.* 1999 Jul; 384: 309–36.
107. Mendiratta S, Zhi-chao QU, James M. Enzyme Dependent Ascorbate Recycling in Human Erythrocytes: Role of Thioredoxin Reductase, *Free Radical Biology and Medicine.* 1998 Jul; 252: 221–228.
108. Gruszecki WI, Strzalka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochim Biophys Acta.* 2005 May 30; 17402: 108–15. .
109. Droge K, Schulze-Osthoff S, Mihm D, et al. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J.* 1994; pp.1131–1138.
110. Haddad JJ, Olver RE, Land SC. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem.* 2000; 275 (28): 21130–21139.
111. Becker BF, Reinholz N, Leipert B, et al. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest.* 1991; 100: 176–181.
112. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, et al. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 2004; 75(7): 765–90.
113. Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med.* 1997; 336(3): 186–95.
114. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, et al. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993; 17(3): 347–57.

115. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993; 84(4): 407-12.
116. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37(2): 112-9.
117. Karakoc M, Altindag O, Keles H, Soran N, Selek S. Serum oxidative-antioxidative status in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int.* 2007;27:1131-4.
118. Süleyman DEMİR, Sibel ÖZKURT, Mehmet KÖSEOĞLU, Yaşar ENLİ, Diler ASLAN, Naciye GÜMÜŞSU. Sigara içenlerde plazma lipid peroksidasyonu. *Solunum* 3: 57-59, 2001.
119. Delaney, B., Carlson, T., Frazer, S. et al. Evaluation of The Toxicity of Concentrated Barley B-glucan in a 28-day Feeding Study in Wistar Rats. *Food and Chemical Toxicology.* 41 (2003): 477–487.
120. Gardiner, T., 2000. A Review: Beta-glucan Biological Activities. *GlycoScience* 1 (32): 1-6.
121. <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html>.
122. Züllü, F., Suter, F., Biltz, H., Nissen, H.P., 1998. Improving Skin Function with CM-glucan, a Biological Response Modifier from Yest. *International Journal of Cosmetic Science*, 20: 79-86.
123. Wang, Y., Yao, S., Wu, T., 2003. Combination of Induced Autolysis and Sodium Hypochlorite Oxidation for The Production of *Saccharomyces cerevisiae* (1-3)- B-D-glucan. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19: 947-952.
124. Vetvicka, V., Yvin, J., 2004. Effects of Marine B-1,3 Glucan on Immune Reactions. *International Immunopharmacology*, 4: 721-730.
125. Kayali, H., Özdag, M.F., Kahraman, S., et al., 2005. The Antioxidant Effect of Beta-Glucan on Oxidative Stress Status in Experimental Spinal Cord Injury in Rats. *PubMed Medline.* 28(4):298-302.
126. Ahmed, G., 2000. B-Glucan: The Next Generation. *Total Health*; 22, 4; *Health & Medical Complete* sf: 34.
127. Keller, T., 2000. Compounding with B-1,3—Glucan. *International Journal of Pharmaceutical Compounding.* 4 (5): 342-345.
128. <http://immupet.com/Scientifically-Proven.cfm>.
129. Hoffman, O.A., Olson, E.J., Limper, A.H., 1993. Fungal beta-glucans Modulate Macrophage Release of Tumor Necrosis Factor-alpha in Response to Bacterial Lipopolysaccharide. *Immunol Lett.* 37: 19-25.
130. Soltys, J., Quinn, M.T., 1999. Modulation of Endotoxin- and Enterotoxin- Induced Cytokine Release by in vivo Treatment with Beta-(1,6)-Branched Beta- (1,3)-Glucan. *Infect Immun.* 67: 244-252.
131. Konopski, Z., Rasmussen, L.T., Seljelid, R., Eskeland, T., 1991. Phagocytosis of Beta-1,3-D-Glucan-Derivatized Microbeads by Mouse Peritoneal Macrophages Involves Three Different Receptors. *Scand J. Immunol.* 33: 297-306.
132. Janusz, M.J., Austen, K.F., Czop, J.K., 1988. Phagocytosis of Heat-Killed Blastospores of *Candida albicans* by Human Monocyte Beta-Glucan Receptors. *Immunology.* 65: 181-185.
133. Suzuki, T., Ohno, N., Adachi, Y., Yadomae, T., 1993. Serum Components Induce Beta-D-Glucan-Inhibitable Uptake of Zymosan Particles by Murine Peritoneal Macrophages. *Biol Pharm Bull.* 16: 223-227.
134. Silva, C.L., Alves, L.M., Figueiredo, F., 1994. Involvement of Cell Wall Glucans in the Genesis and Persistence of the Inflammatory Reaction Caused by the Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiology.* 140: 1189-1194.

135. Adams, D.S., Pero, S.C., Petro, J.B., 1997. PGG-Glucan Activates NFkappaB- like and NF-IL-6-like Transcription Factor Complexes in A Murine Monocytic Cell Line. *J Leukoc Biol.* 62: 865-873.
136. <http://www.bitkiselyag.org/noni-agaci-meyvesi-morinda-citrifolia/>.
137. Alison D. Pawlus and A. Douglas Kinghorn., JPP 2007. Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni)*. 59: 1587–1609.
138. Aalbersberg, W. G. L., Hussein, S., Sotheeswaran, S., Parkinson, S. (1993) Carotenoids in the leaves of *Morinda citrifolia*. *J. Herbs Spices Med. Plants* 2: 51–54.
139. Peerzada, N., Renaud, S., Ryan, P. (1990) Vitamin C and elemental composition of some bushfruits. *J. Plant Nutr.* 13: 787–793.
140. Bui, A. K. T., Bacic, A., Pettolino, F. (2006) Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni). *Phytochemistry* 67: 1271–1275.
141. Solomon N. The tropical fruit with 101 medicinal uses, NONI juice. 2nd ed. Woodland Publishing; 1999.
142. Allen WH, London C. Some information on the ethnobotanical properties of Noni (*Morinda citrifolia*). In: *The useful plants of india*; 1873.
143. Wang MY, Lieher, JG. Induction by estrogens of lipid peroxidation and lipid peroxide derived malondialdehyde-DNA adducts in male Syrian hamsters : role of lipid peroxidation in estrogen-induced kidney carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1941-5.
144. Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahi W, et al. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 1998; 80 Suppl 1: S77-112.
145. Fridovich I: Superoxide dismutase. *Adv Enzymol.* 1974; 4: 35–97. .
146. Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351–358. .
147. Lowry OH, Rosenbrough NJ, at. al. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265–275. .
148. Beutler E: Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. 2nd edition, Grune and Stratton Inc New York; 1984. .
149. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation *Clinical Biochemistry* 37 (2004) 277– 285.
150. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 1103–1111.
151. Suzuki S, Nakamura S, Sakaguchi T, et al. Alteration of reticuloendothelial phagocytic function and tumor necrosis factor-alpha production after total hepatic ischemia. *Transplantation* 1997;64:821-7.
152. Karaayvaz M, at. al. İntestinal ischemia and free radical metabolism. *T Klin J Med Sci.* 1996; 16: 437–439.
153. Uz ZM. Radyasyonla oksidatif hasar oluşturulan ratlarda CoQ10 ve Quersetinin nbirlikte verilmesinin koruyucu etkisi. Uzmanlık tezi, Osman Gazi Ü. T. Fak. Biy. A. D. Eskişehir 2004. .
154. Nina E. Saxton, Johanna L. Barclay, Andrew D. Clouston, Jonathan Fawcett. Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Hepatology* 2002, 36: 241–247.
155. Topaloğlu S, Abbasoglu O, Ayhan A, Sokmensuer C, Kılınç K. Antiapoptotic and protective effects of roscovitine on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Liver*

International 2003,23:300–307.

156. Başay S, Adsan Ö, İnal G, at. al. Verapamil ve alfa-tokoferolün rat böbreğindeki deneysel reperfüzyon hasarı üzerine karşılaştırılmalı etkileri. Türk Üroloji Dergisi 2003; 29 (1): 11–15.

157. Arıcı M. Kas Flepleri iskemi reperfüzyon hasarında quercetin'in etkileri. Uzmanlık tezi, Osman Gazi Ü. T. Fak. Plastik C. Eskişehir, 2006. .

158. Cekin AH, Gür G, Türkoğlu S. The protective effect of L-carnitine on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. Turk J Gastroenterol. 2013 Feb;24(1):51-6.

159. Bayramoglu G, Bayramoglu A, Engur S. The hepatoprotective effects of Hypericum perforatum L. on hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. Cytotechnology. 2013 Jun 23

160. Önder A. İntestinal İskemi-Reperfüzyon Hasarının önlenmesinde Çinko, Alfa tokoferol, buflomedil, pentoksifilin ve ikili kombinasyonlarının rolü. K.S.Ü. T. Fak. Uzmanlık tezi, Kahraman Maraş. 2007.

161. Gulmen S, Kiris I, Kocyigit A. β -Glucan protects against lung injury induced by abdominal aortic ischemia-reperfusion in rats. J Surg Res. 2010 Dec;164(2)

162. Bayrak O, Turgut F, Karatas OF. Oral beta-glucan protects kidney against ischemia/reperfusion injury in rats. Am J Nephrol. 2008;28(2):190-6.

163. Lin YL, Chou CH, Yang DJ, Chen JW, Tzang BS, Chen YC. Hypolipidemic and antioxidative effects of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice on high- fat/cholesterol-dietary hamsters. Plant Foods Hum Nutr. 2012 Sep;67(3):294-302.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Zeynep BAYAT
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 04.06.1987 Afyonkarahisar
Medeni hali : Bekâr
Telefon : 0 (505) 616 62 26
e-posta : zeynepbayat03@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ /Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2013
Lisans	Ege Üniv./Biyokimya	2010
Lisans	Ege Üniv./Biyoloji	2010
Lise	Afyon Kocatepe Anadolu Lisesi	2005

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2011-2013	KSÜ	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- 1.
- 2.

Hobiler

Doğa bilimleri, Yürüyüş yapmak, Seyahat etmek