



T.C.

**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE
EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT VE QUERCETİN'İN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. FATMA İNANÇ TOLUN**

**AHMET ÇAĞRI KIR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KAHRAMANMARAŞ / 2012**

T.C.

**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE
EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT VE QUERCETİN'İN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. FATMA İNANÇ TOLUN**

**AHMET ÇAĞRI KIR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KAHRAMANMARAŞ / 2012**

T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE
EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT VE QUERCETİN'İN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR. FATMA İNANÇ TOLUN

AHMET ÇAĞRI KIR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu araştırma, 2011/4-5 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü
İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından desteklenmiştir**

KAHRAMANMARAŞ / 2012

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Ahmet Çağrı KIR tarafından hazırlanan “Renal iskemi-Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Epigallokateşin-3-gallat ve Quercetin’in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 10.07.2012 tarihinde **oy birliği** ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Ünvan, Ad ve Soyad (DANIŞMAN)

Ana Bilim Dalı, Üniversite Adı

Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

Tıbbi Biyokimya AD.

KSÜ

Ünvan, Ad ve Soyad (ÜYE)

Ana Bilim Dalı, Üniversite Adı

Prof. Dr. Metin KILINÇ

Tıbbi Biyokimya AD.

KSÜ

Ünvan, Ad ve Soyad (ÜYE)

Ana Bilim Dalı, Üniversite Adı

Doç. Dr. Davut ÖZBAĞ

Anatomi AD.

KSÜ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresi boyunca her türlü bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini aldığım ve fikirlerinden faydalandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a

Eğitimim sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocam Prof. Dr. Metin KILINÇ ve Öğretim üyesi hocam Doç Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ, değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Zeynep BAYAT, Arş. Gör. Dr. Elif ŞAHİN'e Tıbbi Biyokimya yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarım Arş. Gör. Velid UNSAL, Meltem GÜNGÖR, Gülcan HASKAYA, Tıbbi Biyokimya yüksek lisans mezunu arkadaşım Yasemin APAK ve tüm biyokimya laboratuvar çalışanlarına.

Tez çalışmamda çok değerli katkıları olan, Doç. Dr. Davut ÖZBAĞ, Doç.Dr. Harun ÇIRALIK, Doç.Dr. Hasan Çetin EKERBİÇER hocalarımıza Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma laboratuvarı personelimiz arkadaşım Abdullah YILMAZ'a;

Her zaman yanımda olan desteğini ve fikirlerini aldığım saygıdeğer babam Yrd. Doç. Dr. İbrahim KIR'a, sevgili anneme, arkadaşlarıma ve aileme en içten teşekkürü bir borç bilirim.

Ahmet Çağrı KIR
Tıbbi Biyokimya AD. Yük. Lis. Öğrencisi

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLO LİSTESİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
KISALTMALAR	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT.....	XII
1. GİRİŞ AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 İskemi/Reperfüzyon Hasarı	3
2.1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarının Mekanizması	3
2.1.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nötrofillerin Rolü.....	7
2.1.3 Komplemanın Rolü.....	8
2.1.4. Endotel Hücresinin Rolü.....	9
2.1.5. Mast Hücresinin Rolü	10
2.2. Böbreğin Yapısı	11
2.2.1. BÖBREK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI	12
2.3. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞUMU	14
2.3.1.Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri	16
2.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	19
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	20
2.3.1.3. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})	20
2.3.1.4. Singlet O_2 (1O_2)	21
2.3.1.5. Hidroperoksit Radikali (HO_2^{\cdot}).....	21
2.3.1.6.Hipokloröz Asit (HOCl)	22
2.3.2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları	22
2.3.2.1.Endojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları	23
2.3.2.1.1.Otooksidasyon	23
2.3.2.1.2. Mitokondrial Elektron Transport Sistemi	23

2.3.2.1.3. Ksantin Oksidaz (XO)	23
2.3.2.1.4. Araşidonik Asit Kaskatı.....	24
2.3.2.1.5. Endoplazmik Retikulum	25
2.3.2.1.6. Peroksizom.....	25
2.3.2.1.7. Plazma Membranı	25
2.3.2.1.8. Redoks Döngüsü	25
2.3.2.1.9. Fagositoz.....	26
2.3.2.2. Eksojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizması	27
2.3.3. Serbest Radikallerin Etkileri	27
2.3.3.1. Hücre İçi Etkileri	27
2.3.3.1.1. Lipit Peroksidasyonu	27
2.3.3.1.2. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	29
2.3.3.1.3. Karbonhidratlara Etkileri	29
2.3.3.1.4. Proteinlere Etkileri.....	29
2.3.3.2. Hücre Dışı Etkiler	30
2.3.3.2.1. Kemotaksi	30
2.3.3.2.2. Rolling	30
2.3.3.2.3. Antiadhezyon Molekülleri İnhibisyonu	30
2.4. ANTİOKSİDANLAR.....	31
2.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	31
2.4.1. Antioksidan Etki Tipleri	31
2.4.1.1. Doğal Antioksidanlar (Endojen).....	32
2.4.1.2. Eksojen Antioksidanlar.....	33
2.4.1.3. Gıda Antioksidanları.....	33
2.4.2. Enzimatik Antioksidanlar	34
2.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	34
2.4.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	35
2.4.2.3. Glutasyon Redüktaz (GR)	35
2.4.2.4. Glutasyon-S-Transferaz (GST)	36
2.4.2.5. Katalaz (CAT).....	36
2.4.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri.....	37

2.4.3.1. E Vitamini (α -tokoferol) ve C vitamini (Askorbik asit)	37
2.4.3.2. Karotenoidler (B Karoten)	38
2.4.3.3. Glutasyon (GSH)	38
2.4.3.4. Ürik Asit (Ürat)	39
2.4.3.5. Melatonin	39
2.4.3.6. Seruloplazmin	40
2.4.3.7. Flavonoidler	40
2.5. Epigallokateşin-3-gallat (EGCG)	44
2.5.1. Quercetin (Q)	47
2.5.1.2. Genel Özellikleri	47
2.5.1.3. Antioksidan Özellikleri	47
3. MATERYAL VE METOD	51
3.1. DENEY HAYVANLARI	51
3.2. DENEY GRUPLARI	51
3.3. KULLANILAN İLAÇLAR	52
3.4. RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI MODELİ	52
3.5. BİYOPSİ ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE HAZIRLANMASI	56
3.6. PROTEİN DÜZEYİNİN TAYİNİ	56
3.6.1. Ayıraçlar	56
3.6.2. Standart Eğrinin Çizimi	57
3.7. MALONDİALDEHİT (MDA) DÜZEYİNİN TAYİNİ	58
3.7.1. Ayıraçlar	58
3.7.2. Standart Eğri Çizimi	59
3.7.3. Hesaplanması	61
3.8. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTE TAYİNİ	61
3.8.1. Ayıraçlar	61
3.8.2. Standart Eğri Çizimi	62
3.8.3. Hesaplama	63
3.9. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-PX) AKTİVİTE TAYİNİ	64
3.10. KATALAZ (CAT) AKTİVİTE TAYİNİ	66
3.11. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	67

3.12. İSTATİSTİK.....	68
4. BULGULAR.....	69
4.1. MDA DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİLER.....	69
4.2. SOD AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLER.....	71
4.3. GPX AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLER.....	72
4.4. KATALAZ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLER.....	73
4.5. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI.....	75
5. TARTIŞMA.....	76
6. SONUÇLAR.....	82
KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ.....	95

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Reaktif oksijen partikülleri	18
Tablo 2: Fagositlerin ürettiği bazı reaktif oksidan ürünler	26
Tablo 3: Flavonoidlerin alt sınıfları ve bazı besinsel kaynakları.....	44
Tablo 4: Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	57
Tablo 5: Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı.....	58
Tablo 6: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	59
Tablo 7: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı	60
Tablo 8: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	62
Tablo 9: SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı.....	62
Tablo 10: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars tüplerinin hazırlanışı.....	64
Tablo 11: Doku örneğinde GSH-Px tayini için deney tüplerinin hazırlanışı.....	65
Tablo 12: Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı.....	67
Tablo 13: Deney gruplarında biyokimyasal parametreler.....	70

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: İskemi-reperfüzyon hasarının mekanizması.....	5
Şekil 2: Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması.....	5
Şekil 3: İskemi-reperfüzyon medelinde tübüler epitelde Ca_{+2} 'un rolü ve hasar oluşturuçu mekanizmaları.....	6
Şekil 4: İskemik hasarda olaylar dizisi	13
Şekil 5: İskemi sürecinde membran hasarı	15
Şekil 6: Serbest radikal oluşumu	17
Şekil 7: Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu.....	18
Şekil 8: Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması.....	24
Şekil 9: Lipid peroksidasyonu sonucu MDA oluşumu.....	28
Şekil 10: İskemide glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın rolü.....	36
Şekil 11: C6-C3-C6 sistemi, benzen halka yapısının birleşimi	41
Şekil 12: Flavonoidlerin kimyasal yapısı	41
Şekil 13: Bazı flavonoidlerin kimyasal yapıları	42
Şekil 14: Flavonoidlerin antioksidan etki mekanizmaları.....	43
Şekil 15: Yeşil çayda bulunan kateşinlerin kimyasal yapısı.....	45
Şekil 16: Quercetin'in kimyasal yapısı.....	48
Şekil 17: Quercetin bileşiğinin açık formülü.....	49
Şekil 18: Sol renal arter'in diseke edilişi.....	54
Şekil 19: Sol renal artere klemp uygulanması ve iskemi başlangıcı	54
Şekil 20: İskemi sonrası 30.dk iskemik böbrek.....	54
Şekil 21: İskemi sonrası 60.dk iskemik böbrek.....	55
Şekil 22: Reperfüzyon sonrası sol böbrek materyali	55
Şekil 23: Reperfüzyon sonrası sol böbrek piyesi ikiye bölündüğündeki görünümü	55
Şekil 24: Protein standart eğrisi.....	57
Şekil 25: MDA (Malondialdehit) standart eğrisi.....	60
Şekil 26: SOD (Süperoksit dismutaz) standart eğrisi	63
Şekil 27: Gruplarda MDA düzeyleri	69
Şekil 28: Gruplarda SOD aktivitesi	71
Şekil 29: Gruplarda GSH-Px aktivitesi	72
Şekil 30: Gruplarda CAT aktivitesi	74

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
PMNL	: Polimorfonükleer Lökositler
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
İ/R	: İskemi reperfüzyon
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
PLC	: Fosfolipaz C
PIP2	: Fosfotidil İnozitol Bifosfat
IP3	: İnozitol Trifosfat
O₂⁻	: Süperoksit Anyon Radikali
HOCl	: Hipoklorik Asit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
TNF- α	: Tümör Nekroz faktör Alfa
XO	: Ksantin Oksidaz
IL-6	: İnterlökin 6
IL-1 β	: İnterlökin 1 Beta
IL-12	: İnterlökin 12
C5a	: Kompleman 5a
NO	: Nitrik Oksit
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
İNF- γ	: Gamma İnterferon
ICAM-1	: İntersellüler Adhezyon Molekülü
ELAM-1	: Endotelial Lökosit Adhezyon Molekülü-1
VCAM-1	: Vasküler Sellüler Adhezyon Molekülü
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
RNA	: Ribonükleik Asit
ROR	: Reaktif Oksijen Radikalleri
KSÜ	: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Q	: Quercetin
EGCG	: Epigallokateşin
O₂	: Oksijen
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit
HO₂·	: Perhidroksi Radikali
OH·	: Hidroksil Radikali
¹O₂·	: Singlet Oksijen
NO·	: Nitrik Oksit Radikali
H·	: Hidrojen Radikali
SOD	: Süperoksit dismutaz
CAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutatyon Peroksidaz
ROO	: Peroksil Radikali
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
FMN	: Flavin Mononükleotit
ETS	: Elektron Transport Sistemi
PGG	: Prostoglandin G
PGH	: Prostoglandin H
XDH	: Ksantin Dehidrogenaz
-SH	: Tiyol
L·	: Yağ Asidi Zincir Radikali
L-O₂	: Lipit Peroksil Radikali
MDA	: Malondialdehit
GSSG	: Okside Glutatyon
GSH	: Redükte Glutatyon
GR	: Glutatyon Redüktaz
OD	: Optik Dansite
GST	: Glutatyon-S-Transferaz
PAF	: Platelet Aktive Edici Faktör

ÖZET

Böbrek iskemisi durumu, abdominal aorta yönelik cerrahilerde suprarenal klempaj sonrası, kısmi nefrektomi (böbrek alımı), böbrek transplantasyonu, sepsis (bakteri veya diğer patojenlerin kan dolaşımına geçmesi), çeşitli ürolojik müdahaleler ve hidronefrozis gibi çeşitli klinik durumlarda görülür.

Biz bu çalışmamızda daha önceden de İ/R hasarına etkileri araştırılmış olan antioksidanlardan Epigallokateşin-3-gallat (EGCG) ve Quercetin (Q) ayrı ayrı ve birlikte, renal iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık. Çalışmada Wistar Albino türü 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar sham grubu, kontrol (iskemi reperfüzyon (İ/R)) grubu, İ/R'dan 15 dk önce verilen Q grubu, EGCG grubu ve bu etkenlerin birlikte verildiği EGCG+Q (kombine) grup olarak 5 gruba ayrıldı. Sham grubundaki sıçanlara sadece laparotomi yapıldı ve 120 dk beklendi, kontrol grubuna (İ/R) 60 dk iskemi sonrası 60 dk reperfüzyon uygulandı. Ayrıca sham ve kontrol grubuna laparotomiden 15 dk önce 50 mg/kg serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi. EGCG, Q ve kombine (EGCG+Q) gruplara ise İ/R dan 15 dk önce bu etken maddeler intraperitoneal olarak verildi ve 60 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyon gerçekleştirildi. Reperfüzyon sonrasında yüksek doz anestezi madde verilerek öldürülen sıçanlardan böbrek dokusu alındı. Alınan örneklerden biyokimyasal olarak lipid peroksit ürünü olan Malondialdehit (MDA) düzeyleri ve enzimatik savunma sistemlerinden Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Katalaz (CAT) aktiviteleri ölçüldü. Dokularda histopatolojik inceleme yapıldı. Sonuçlar birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Biyokimyasal analiz sonunda deney kontrol grubu (İ/R) MDA düzeyi ilaç verilen gruplara oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). SOD enzim aktivitesi açısından en yüksek değerlerin ilaç verdiğimiz gruplarda anlamlı şekilde yüksek çıktığı görülmüştür ($p<0.05$). Ortalama SOD değerlerini hesapladığımızda en düşük değer deney kontrol (İ/R) grubunda olduğu en yüksek değer ise EGCG+Q (kombine) grubunda olduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında, SOD aktivitesinin artışı hasar sırasında oluşan serbest radikallere karşı bir savunma mekanizmasının oluşturulduğunu göstermektedir.

Katalaz ve GSH-Px enzim düzeylerine baktığımızda deney kontrol grubundaki CAT ve GSH-Px düzeyi ilaç verilen gruplara oranla anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bu oran kombine (EGCG+Q) grubun GSH-Px enzim aktivitesinde daha belirgin ve anlamlı şekilde görülürken, CAT aktivitesinde ise kontrol grubuna göre belirgin bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Bu sonuçlar uyguladığımız modelde böbrek İ/R hasarı oluştuğunu göstermektedir. İ/R hasarı sonrası oluşan oksidatif hasarı ortadan kaldırmaya çalışan ajan ve antioksidan enzimlerden SOD ve GSH-Px enzimi aktivitesi ise ilaç verdiğimiz gruplarda, kontrol (İ/R) grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu bulgulardan yola çıkılarak kullandığımız EGCG, Q ve bunların kombine uygulamasının böbrek İ/R hasarına karşı koruyucu etkilerinin olabileceği anlaşılmaktadır. Bu konuda farklı süre ve doz çalışmalarının yapılmasının konunun aydınlatılması açısından faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: İskemi reperfüzyon, sıçan, EGCG, Q, malondialdehit, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz.

ABSTRACT

The situation of renal ischemia is seen at clinical situations such as klem-paj suprarenal abdominal aorta after surgery for partial nephrectomy (renal uptake), renal transplantation, sepsis (bacteria or other pathogens, to pass into the bloodstream), various urological interventions, and hydronephrosis.

In this study, it is aimed to examine the effect of the antioxidant epigallocatechin -3-gallat (EGCG) and Quercetin (Q) together and separately on renal ischemia-reperfusion injury, which were previously studied on the effects of I/R injury. In the study, 40 male rats of Wistar Albino type are used. The rats are divided into five groups as control group (renal ischemia-reperfusion (I/R)), Q group given 15 minutes after I/R, EGCG group and combined group that is given these factors together.

Sham rats were subjected to laparotomy, and 120 min was waited, control group is subjected to 60 min. Reperfusion after 60 minutes of ischemia, and also sham and control (I/R) groups are given 50 mg/kg intraperitoneal saline after laparotomy. EGCG, Q and combined groups are given these active ingredient in intraperitoneal after I/R and 60 minutes of ischemia and 60 minutes of reperfusion is carried out.

After reperfusion, renal tissue was taken from killed rats given a high dose of anesthetic agent. The biochemical product of lipid peroxide malondialdehyde (MDA) levels and enzymatic defense systems in the superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) activities were measured from the samples. Tissues were examined histopathologically. Results were statistically compared with each other. Biochemical analysis of the drug in the experimental groups compared with the control group were significantly higher MDA levels ($p < 0.05$). The highest values of SOD activity was significantly higher in groups where drugs were given ($p < 0.05$). Estimating the average values of SOD, the lowest value is in the experimental control (I / R) group and the highest figure is in EGCG + Q (combined) group. In light of these findings, it shows that increase in SOD activity puts up a defense mechanism against free radicals generated during damage.

Looking at the experimental levels of catalase and GSH-Px, CAT and GSH-Px levels in the control group were significantly lower than in groups given the drug ($p < 0.05$). This ratio is seen at (EGCG + Q) group significantly more noticeable and meaningful at GSH-Px enzyme activity, while there was no significant difference at CAT activity than the control group, ($p > 0.05$).

These results show that renal I / R injury have occurred in applied model. Activities of agent and the antioxidant enzymes SOD and GSH-Px enzyme that attempts to eliminate the oxidative damage were significantly higher in drug given groups than control (I / R) group ($p < 0.05$). Based on these findings, used EGCG, Q, and their implementation of the combined renal I / R are understood that can have protective effects against oxidative damage. It is concluded that different duration and dose studies will be useful to clarify the issue.

Key words: Ischemia-reperfusion, rats, EGCG, Q, malondialdehyde, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase.

1. GİRİŞ AMAÇ

İskemi bir dokuya gelen kan akımının azalması veya kesilmesine denir. Reperfüzyon ise kan akımının yeniden başlamasıdır. Renal arterde iskemiye takiben reperfüzyon sağlanması sırasında, dokunun ihtiyacı olan oksijen ve bazı metabolitlerin sunumu ile birlikte paradoksal olarak bazı lokal ve sistemik olaylar sonucu hasarlar meydana gelmektedir. İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarının oluşumunun anlaşılmasında ve bu hasarların önlenmesinde mesafe katedilmesine rağmen bu hasarların iyileştirilmesi konusunda tam olarak istenilen sonuçlara ulaşılamamıştır.

Özellikle renal arterlerdeki kan akımının engellendiği hastalıklar ve bu hastalıkların tedavisi sırasında oluşan iskemi-reperfüzyon hasarı önemli şekilde morbidite ve mortaliteye yol açabilmektedir. Ayrıca böbrek nakilleri sırasında renal arterde meydana gelen iskemi-reperfüzyon hasarı da ciddi problemler oluşturabilmektedir. Bu nedenle iskemi-reperfüzyon hasarlarının önlenmesinde ideal sonuçlar veren değişkenlerin henüz fazla sayıda bulunmamış olması bu konuda yapılacak yeni çalışmalara gerekçe teşkil etmektedir.

İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücre ölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasıyla yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda (reperfüzyon), özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan reaktif oksijen radikalleri (ROR) dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir ^{1,2}.

Reaktif oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına karşılık çok sayıda hücre koruyucu enzimler ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Vücuttaki hücresel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki bir denge oluşturmaktadır ^{3,4}. Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerdir ^{3,4}.

Çalışmamızda kullandığımız epigallokateşin (EGCG) ve quersetin (Q) önemli antioksidan maddelerdir. Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat (ECG) ve epigallokateşin gallat (EGCG) hem ilaç etken maddesi olarak hem de diyetle oldukça önemli yeri olan flovanollerdir ⁵.

Çay yaprağında bol miktarda bulunan polifenollerin yaklaşık 4'de 3'nü flovanoller, flovanollerin de % 60-70'ini epigallokateşin-3-gallat oluşturmaktadır ⁶. Çayın antioksidan etkili bileşikleri olan polifenoller kuru çayın %35'ini oluştururlar. Başlıca polifenoller; flovanoller (kateşinler), flavonlar ve fenolik asitlerdir. Hem siyah hem de yeşil çaydaki en önemli kimyasallar ise kateşinlerdir ⁷.

Epidemiyolojik çalışmalar hem yeşil hem de siyah çayın her yaş grubu için başta koroner kalp hastalıkları, inme, kalp damar hastalıkları, hipertansiyon, mide ve kolorektal hastalıklar, çeşitli kanser türleri, karaciğer hastalıkları ve artrit karşı koruyucu, ayrıca antiviral, antiinflamatuvar ve kemik yoğunluğunu düzenleyici etkiye sahip olduğunu göstermiştir ^{8,9}.

Hem yeşil hem de siyah çayın, içeriğinde bulunan polifenolik bileşikler nedeniyle antioksidan bir içecek olduğu ve kronik hastalıklardan koruyucu etkisini bu yolla yaptığı belirtilmektedir ^{8,9}.

Quercetin, demir (Fe⁺²) ve bakır (Cu⁺²) aracılığı ile hidroksil radikali oluşumunu önleyerek oksidatif hasara karşı koruma yapan çok güçlü bir antioksidandır. Serbest oksijen radikallerinden ·OH ve singlet oksijen (O-²) gibi yapıları temizlediği ve ksantin oksidaz ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Deneysel olarak İ/R hasarı oluşturulmuş modellerde de quercetin dokuyu İ/R hasarından koruduğu gösterilmiştir ^{10,11,12}. Quercetin, antioksidan özellikleri olan bir bitki pigmentidir. Bu pigment, kötü kolesterolün okside olmasını önleyebilir ve hücrelerin kansere dönüşmesini geciktirebilir. Ayrıca quercetin adlı madde çok güçlü bir antioksidan olup kolesterolü düşürmekte, kalp hastalıkları ve akciğer kanseri riskini azaltmaktadır. Quercetin bir antioksidan madde olduğu akciğerleri ve solunum yollarını sigara ve kirli havanın etkilerinden korumaya yardımcı olduğu saptanmıştır ¹³.

Bu çalışmada; Renal arterin geçici klempajı sonucu oluşacak iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesi ya da azatılmasında antioksidan etkisi olduğu bilinen epigallokateşin-3-gallat ve antiinflamatuvar, antimutajenik etkili antioksidan quercetin ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında koruyucu etkilerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarı

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir. İskemi sonucunda doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücrelölüm meydana gelir. Reperfüzyon ise dokunun kanlanmasının yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda (reperfüzyon), özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan serbest oksijen radikalleri (SOR) dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir ¹.

İskemi sonucu hipoksi oluşmakta, oluşan hipoksi ise aerobik oksidatif solunumu etkileyerek, son derece önemli ve genel bir hücre zedelenmesi ve ölüm nedeni olmaktadır ¹⁴. İskemi uzun süre devam ettiği takdirde enerji eksikliğine bağlı olarak aşağıdaki olaylar oluşur: İskemi sonucu oksijenin azalması, krebs döngüsüyle aerobik oksidasyonda azalmaya ve hücrede bulunan adenozin trifosfat (ATP) miktarında düşüşe neden olur. Bu durum adenozin difosfat (ADP) ile fosfat birikimi ve Embden-Meyerhoff yolundaki anaerobik likolizde artışla 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 redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) rejenerasyonunun engellenmesi ve serbest radikal oluşumu gibi iskemik hasar oluşturan etkenlerin gelişimini arttırmaktadır ¹⁵.

2.1.1. İskemi Reperfüzyon Hasarının Mekanizması

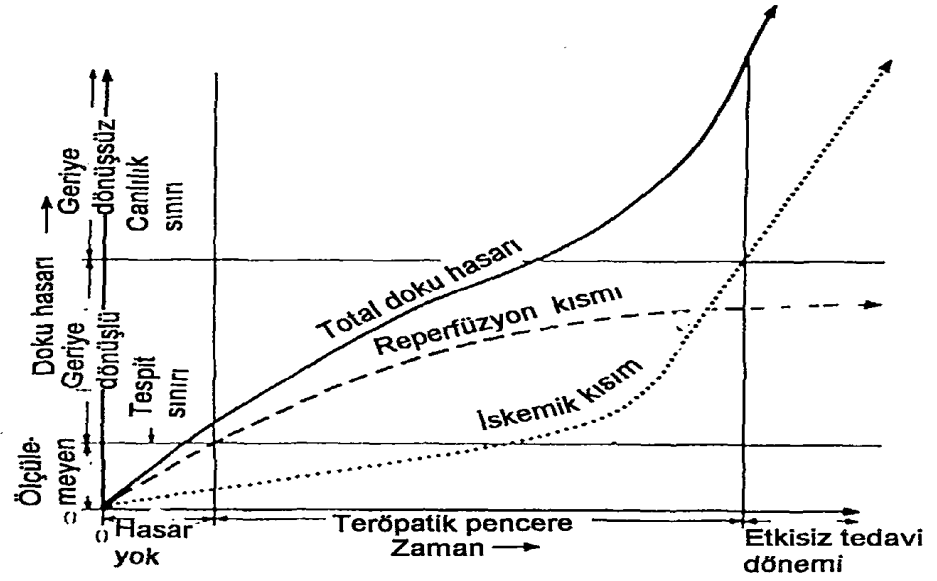
İskemi ve reperfüzyon sırasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca⁺² artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşarak, oksidatif strese neden olmaktadır ^{16,17}. İskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarının fizyopatolojisinde, SOR'nin önemli rol oynadıkları bildirilmektedir ^{16,18}. Serbest radikaller nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler, lipitler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısındaki hemen hemen tüm biyomoleküllerle reaksiyona girerek bunlar üzerinde geriye dönüşlü veya dönüşsüz

etkiler meydana getirebilmektedirler ^{4,17}. İskemi sırasında küçük oranda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar da lipid peroksidasyonuna yol açarak hasarı arttırmaktadırlar ².

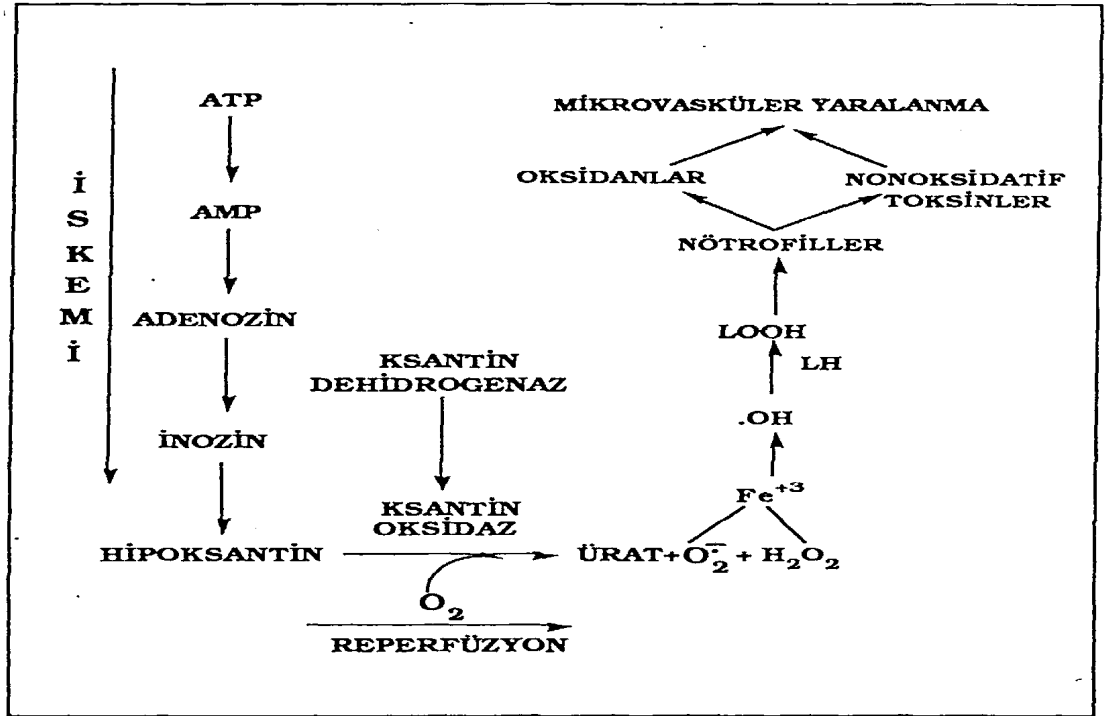
Mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun engellenmesine neden olan hipoksi, hayati önemi olan ATP yapımını durdurur. Kritik noktadan sonra öldürücü membran zedelenmesine neden olur. Aynı zamanda oluşan reperfüzyonda hücrede şu hasarlara neden olmaktadır:

- 1-Ksantin oksidaz kaynaklı serbest radikallerin oluşumu
- 2-Hasarlı endotele nötrofil yapışmasında artış
- 3-Enerji kaybı olan organa reperfüzyon sırasında Ca^{+2} taşınması
- 4-Post iskemik dönemde adenin nükleotit sağlanmasındaki yetersizlik, hücrede enerji açığı.

İskemide ATP, ADP, AMP, inozine ve hipoksantin'e yıkılır. Normalde hipoksantin ksantinoksidaz ile ksantin ve ürik aside okside olur. Bu birikim hipoksantin oksijenizasyonu için substrat fazlalığı yaratmaktadır. Reperfüzyonda ani ve fazla miktarda O_2 sağlandığından, hipoksantin'in ksantine oksidasyonu, süperoksid radikallerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır ¹⁹.



Şekil 1: İskemi-reperfüzyon hasarının mekanizması^{20,21,22}.

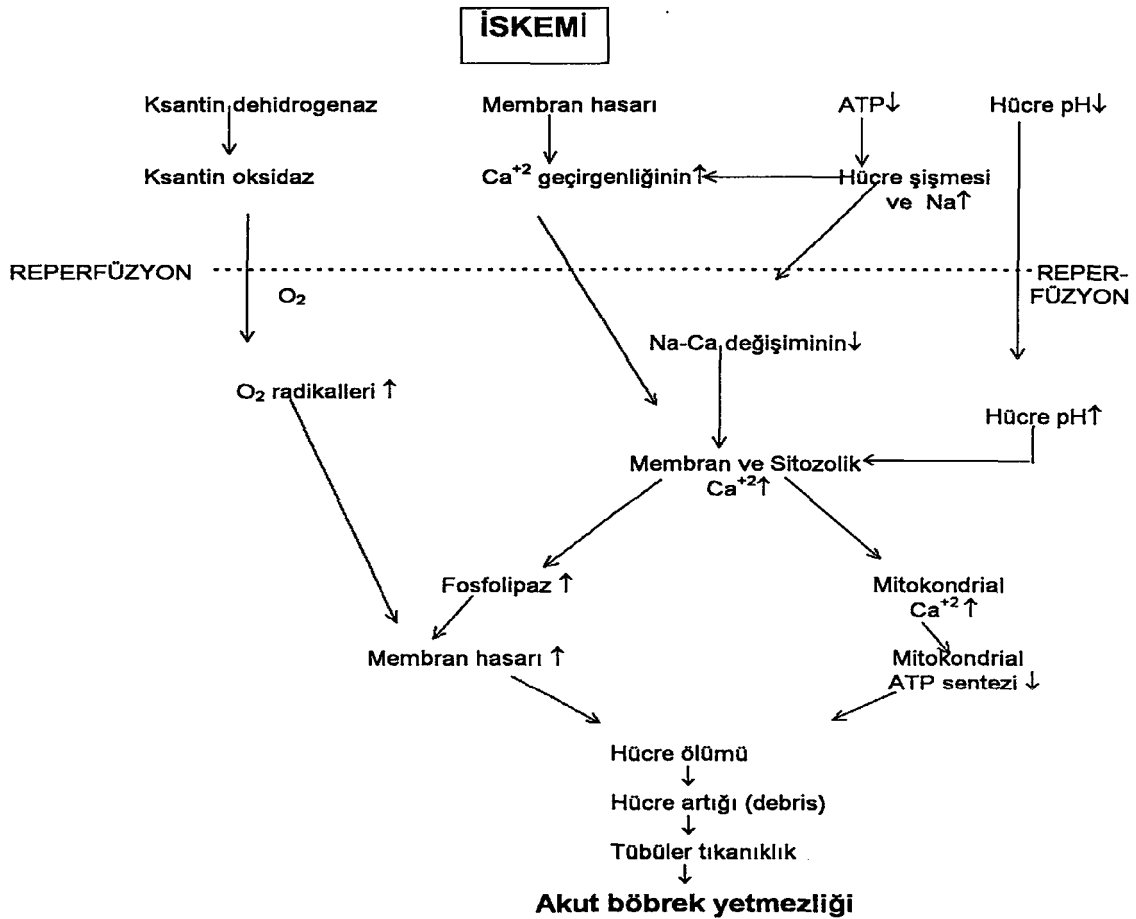


Şekil 2: Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması²³.

Reperfüzyon dönemindeki, hücresel asit-baz dengesindeki değişiklikler ve yeniden oksijenlenme hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırdığı ortaya konmuştur. İskemik dönemdeki düşük pH seviyelerinin, dokuyu iskemik hasardan koruduğu böbrek gibi birçok organda gösterilmiştir. Asidozun, anoksida artan Ca^{+2} 'un geri

emilimini inhibe ederek, dokuyu hasardan koruması ve buna zıt olarak reperfüzyon döneminde pH yükselmesiyle hücre içi Ca^{+2} 'un artması, hücre içi pH değerlerinin Ca^{+2} 'a bağımlı doku hasarının oluşumunda önemli bir faktör olduğunu düşündürmektedir²⁴.

İskemi sonucunda ATP düzeylerinin düşmesi, endoplazmik retikulum ve mitokondrinin ATP bağımlı Ca^{+2} 'un sitozolik regülasyonunu oluşturmasına engel olur. İskemi-reperfüzyon döneminde, sitoplazmik Ca^{+2} regülasyonunun sağlanamaması ve hasarlı membranlarda Ca^{+2} geçirgenliğinin artması, fazla Ca^{+2} yüküne maruz kalan böbrek korteksindeki mitokondrielerde, oksidatif fosforilasyon işlevinin bozulmasına neden olur. Mitokondrial solunum yerine getirilemez ve artan Ca^{+2} miktarıyla işlev bozukluğu doğru orantılıdır²⁴.



Şekil 3: İskemi-reperfüzyon medelinde tübüler epitelde Ca^{+2} 'un rolü ve hasar oluşturucu mekanizmaları²⁴.

2.1.2. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nötrofillerin Rolü

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir²⁵.

Bilindiği gibi nötrofiller fagositoz olayı ile canlıyı enfeksiyöz ajanlardan koruyan kan hücreleridir. Yapılan çalışmalarda, iskemik hücrelerin kemoatraktan maddeleri ve adhezyon moleküllerini salgılayarak, nötrofil ve trombositlerin vasküler endotele adhezyonuna dolayısıyla inflamatuvar yanıtı açtığı gösterilmiştir^{27,28}.

İskemi -reperfüzyon ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir²⁹. Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür³⁰. Bunlar:

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

Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar¹⁰. Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin gelişmesi, normalde immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir³¹. Hücre ölüm yolağındaki düzensizlikler, iskemi-reperfüzyon hasarının yanı sıra, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da yol açabilmektedir³². Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir^{33,34}:

- Fosfolipaz A2 aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir.
- Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır.
- SOR üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü araçlarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşım yoluyla ortamdan uzaklaştırılırlar^{32,35}.

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz ezimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; Aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması ile SOR'un salınması "solunum patlaması" olayını meydana getirmektedir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen perokside dönüşmektedir. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerinden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kollajenaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşmaktadır^{32,36}.

2.1.3. Komplemanın rolü

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proinflamatuvar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır³⁷:

- Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1)

- İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1)
- E-selektin
- P-selektin

C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonunu ve kemotaksisi arttırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar^{32,33}.

2.1.4. Endotel hücresinin rolü

İskemi-reperfüzyon hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olmaktadır. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretmektedir. NO arteriyel dolaşımında ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olmaktadır³⁸.

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I2, PG E2), büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A2 (TxA2) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir²⁵.

Nitrik oksitin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipit radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler³⁴.

2.1.5. Mast hücrelerinin rolü

Mast hücreleri genellikle yuvarlak veya oval şekilde, 10-30 µm çapındadırlar. Sahip oldukları salgı granülleri 0,3-2,0 µm çapındadır. Mast hücreleri yine bağışıklık sisteminde yer alan ve kanda bulunan bazofil granülositlerine benzerler. Benzerlikleri dolayısıyla mast hücrelerinin yerleşmiş bazofil hücreleri olduğu varsayımı ortaya atılmıştır. Fakat daha sonraki bulgular mast hücrelerinin kemik iliğinden köken aldığını göstermiştir. Bazofil hücreleri kemik iliğinden olgunlaşmış olarak ayrılırken mast hücreleri olgunlaşmamış (immatür) olarak ayrılırlar. Dokulara yerleşince olgunlaşır, farklı mast hücrelerine dönüşürler^{39,40}.

İki tip mast hücresi tanımlanmıştır; bağ dokularında bulunan mast hücreleri ve mukozal mast hücreleri. Mukozal mast hücrelerinin aktiviteleri T hücrelerine bağımlıdır. Bağ dokularında bulunan mast hücreleri çok sayıda bazofilik granüller içerir. Mast hücreleri fagositoz yapar, antijen işler, sitokin üretir, vazoaktif madde salgırlar. Fagositoz yaparak bakterileri öldürebildiği bilinse de bu etkisi fagositlerden daha azdır^{39,40}.

Diğer bağışıklık sistem hücrelerini inflamasyon ve iltihap alanına toplaması mast hücrelerinin en önemli fonksiyonlarından biridir. Mast hücresi sinir hücresiyle 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 vazodilasyona 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. İnterstisyel nefrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve romatizmal hastalıklarda dokularda mast hücresi artışı meydana gelir. Bu bakımdan mast hücrelerinin inflamatuvar olaylara katıldığı görülür⁴¹. Mast hücreleri membranlarında Immüoglobulin E (IgE) reseptörlerinin yanı sıra, Immüoglobulin G (IgG) ve kompleman reseptörleri bulunur^{39,40}.

Alerjik reaksiyonlarda, mast hücreleri, bir allerjen zaten hücreye bağlanmış olan bir IgE'ye bağlanana kadar inaktif kalırlar. Allerjenler genellikle protein veya polisakkarittirler. Allerjen mast hücrelerinin yüzeyindeki IgE'ye moleküllerinin Fab kısmına bağlanır. Bulgulara göre iki veya daha fazla IgE molekülüne antijenlerin bağlanması (yani çapraz bağların oluşması) sonucu mast hücresi aktive olmaktadır.

Aktive olduktan sonra mast hücreleri hızlıca granüllerini ve çeşitli hormonal mediatörleri interstitiuma salarlar. Farklı formlardaki (IgE dışındaki, kompleman sistemi gibi) aktivasyon süreçleri de mümkündür, tanımlanmıştır.

Aktivasyon sonucu hücrelerarası (interselüler) ortama salınan moleküllerden bazıları:

- Granüllerde önceden sentezlenip depolananlar:
 - histamin
 - proteoglikanlar, başlıca heparin
 - serin proteazları
- Uyarılardan sonra sentezlenip derhal serbest bırakılan:
 - prostaglandin D2
 - lökotrien C4
 - sitokinler

Ayrıca, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) mast hücrelerinde hem önceden sentezlenip depolanmakta, hem de aktive olan hücrelerde sentezlenmektedir ^{39,40}.

2.2. BÖBREĞİN YAPISI

Böbrekler insan vücudunda retroperitoneal kavitede, paravertebral yerleşimli olup, 12. torasik ve 3. lomber vertebralar arasında uzanırlar. Sağ böbrek, karaciğerin sağ lobunun büyük olması ve basısı nedeni ile sola göre 1-2 cm daha aşağıda bulunur. Her bir böbrek yaklaşık olarak 150-200 gr ağırlığında olup, 12-13 cm uzunluğunda, 6-7 cm eninde ve 2,5-3 cm derinliğindedir ⁴².

Her bir böbrek abdominal aortadan köken alan renal arterler ile kanlanır. Renal arter hilustan böbreğe girdikten sonra önce interlobar daha sonra arkuat arterlere ayrılır. Arkuat arterlerden dik olarak interlobüler arterler çıkar. Bu arterlerden glomerüle giden afferent arterioller köken almaktadır ⁴³.

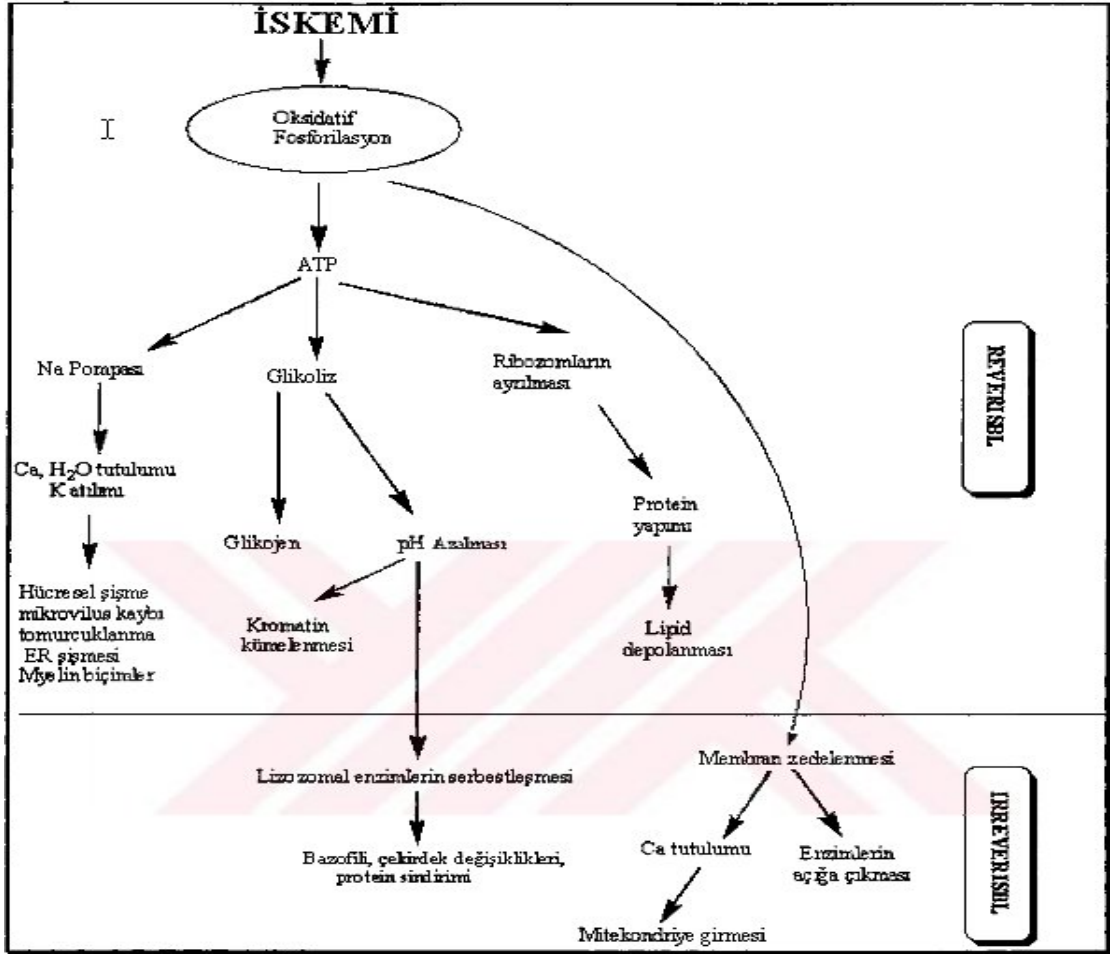
Böbreğin bütün yüzeyi kalın fibröz bir kapsülle örtülüdür. Kapsülün hemen altında yer alan böbrek parankiminin en dışına korteks, korteksle toplayıcı boşluklar arasında kalan kesimine de medulla denir. Korteks bölgesinde glomeruller, proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller ve toplayıcı kanallar bulunur. Böbrek parankiminin daha derin bölgeleri medulladır. Medullanın kortekse yakın kesimlerinde de henle kulpu, vaza rekta ve toplayıcı kanalların terminal uçları bulunur. Medullada dikkati çeken en önemli yapılar, geniş tabanı kortikomedullar birleşim hattında, sivri ucu da renal pelvise

bakan renal piramidlerdir. Piramidin pelvise bakan sivri ucuna papilla denir. Üreterin hilusta genişleyerek oluşturduğu huni biçimli yapıya pelvis denir. Pelvisin en dışında majör kaliksler ve onların bölmeleri olan minör kaliksler yer alır. Papillalar minör kalikslere açılırlar. Renal arter, ven, lenfatikler, sinirler ve üreterin böbreğe giriş çıkış yaptığı mediale bakan yüzüne hilus denir. Hiler yapılar; en önde ven, arada arter ve en arkada pelvis olacak şekilde sıralanmışlardır ⁴⁴.

Kan, böbreklere aortanın her iki yanından süperior mezenterik arterin çıktığı yerin biraz altından ayrılan renal arterler vasıtasıyla gelir bu arterler böbrek hilusuna tek bir dal halinde ulaşırlar. Arter tam hilusta ön ve arka segmenter dallarına ayrılır. Arkaya giden segmenter dal böbreğin kutupları dışında kalan bölgelerine kan taşır. Ön dal ise genellikle kanı üst ve alt kutuplara ve gövdeye taşıyacak 4 dala bölünür. Bu iki segmenter arter gerçek anlamda birer uç arterdir ve aralarında kollateral ilişki yoktur ⁴⁴.

2.2.1. BÖBREK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

Dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik etkenle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulmasına iskemi denir. İskemi sonucunda doku hipoksida kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur hatta hücrel ölüm meydana gelir ^{37,45}. Reperfüzyon ise dokunun kanlanması yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda, özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler tarafından salınan serbest oksijen radikalleri dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar. Bu olaya reperfüzyona bağlı doku hasarı denir ^{1,45}.



Şekil 4: İskemik hasarda olaylar dizisi ¹

Serbest oksijen radikallerinin potansiyel zararlarına çok sayıda hücre koruyucu enzimleri ile karşı koyulur ve antioksidan maddeler ile radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Vücuttaki hüresel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasındaki ilişki bir denge oluşturmaktadır. Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerdir ⁴⁵.

İskemi ve reperfüzyon sırasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca^{+2} artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda serbest oksijen radikalleri oluşarak, oksidatif strese neden olur ⁴⁶. İskemi-reperfüzyon hasarının fizyopatolojisinde, SOR'nin önemli bir rol oynadıkları bildirilmektedir. Serbest radikaller nükleik asitler, serbest amino asitler, proteinler,

lipitler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu makromolekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmaların yapısındaki hemen hemen tüm biyomoleküllerle reaksiyona girerek bunlar üzerinde geriye dönüşlü veya dönüşsüz etkiler meydana getirebilmektedirler^{16,17}. İskemi sırasında küçük oranda serbest radikal oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarda serbest radikal oluşmakta ve bunlar da lipit peroksidasyonuna yol açarak hasarı arttırmaktadırlar^{45,46}.

2.3. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞUMU

Belli durumlar altında daha önceden iskemik duruma getirilmiş fakat ölmemiş hücredeki kan akımı düzeltildiğinde zedelenme düzeleceğine daha da artar. Sonuç olarak dokular iskemik hasar sonucunda irreversibl olarak kaybolmaya devam eder. Buna iskemi-reperfüzyon zedelenmesi denmekte ve bu doku için önem arz etmektedir^{20,51}.

Serbest radikallerin oluşması sonrasında yeni hasar gelişir. Bu hasar oksijenin yeniden kullanımı ile veya olay yerine gelen inflamatuvar hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Reaktif oksijen ürünleri, mitokondrial permeabilite değişimini daha ileri yönlendirebilir. Bu hücrelerde antioksidan mekanizmalarda etkilenmiştir^{20,51}.

Tekrar kanlanma ile kalsiyum ortama gelir ve hücre içi kalsiyum dengesi sağlanamadığından Ca^{+2} etkili yollar aktive olur ve hücre bütünlüğünün kaybolmasına yol açar. İskemik hasar sitokinlerin üretimi, hipoksik parankimal ve endotelial hücrede artmış adhezyon molekülleri ekspresyonu ile birlikte dir. Bu ajanlar inflamasyona neden olur ve hücreler direkt hasar yanı sıra serbest radikallerin artışına da yol açarak ek zedelenmeye neden olur. Son verilere göre kompleman sistemi de olaya karışmaktadır²⁰.

Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. Oksijen hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşemez ve süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur⁵¹.

Serbest radikaller üç farklı şekilde oluşur⁵¹:

1- Normal bir molekülün kovalent bir bağının her kısmında ortaklanmamış bir elektron kalacak şekilde homolitik parçalanması

2- Normal bir molekülün tek bir elektronunu kaybetmesi

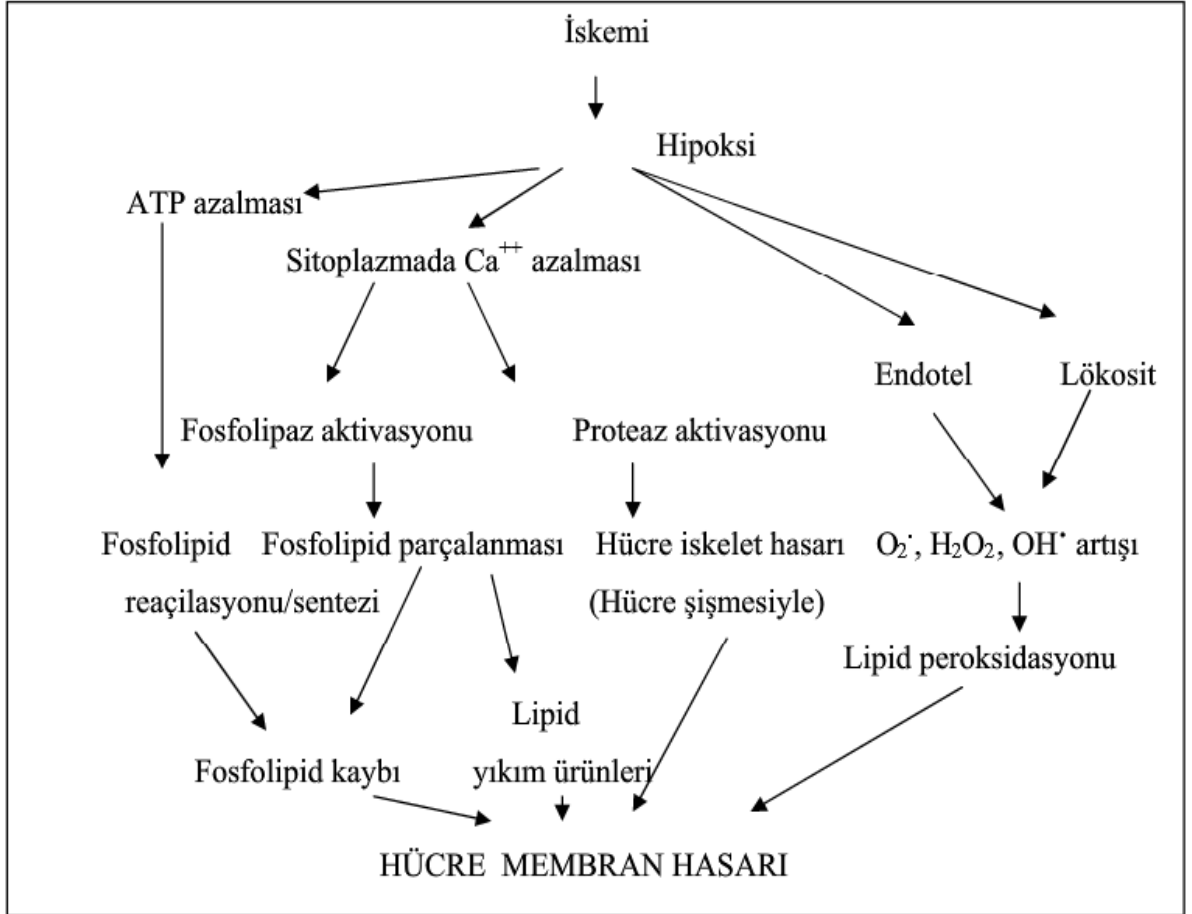
3- Normal bir moleküle tek bir elektron ilavesi

Serbest radikaller pozitif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler³⁸.

- Elektron transferi ile radikal oluşumu: $A + e^- \rightarrow A^-$
- Homolitik füzyonla radikal oluşumu: $X : Y \rightarrow X^{\cdot} + Y^{\cdot}$
- Heterolitik füzyonla radikal oluşumu: $X : Y \rightarrow X^{\cdot-} + Y^+$

Biyolojik sistemlerde elektron transferi ile radikal oluşumu homolitik füzyondan daha yaygındır. Homolitik füzyon; yüksek sıcaklık, ultraviyole ışığı veya iyonize radyasyondan elde edilecek enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Heterolitik füzyonda ise serbest radikaller oluşmamakta ve ürün olarak sadece yüklü gruplar meydana gelmektedir³⁸.

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasında denge korunmadığı takdirde hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır¹⁰¹.



Şekil 5: İskemi sürecinde membran hasarı¹⁰¹

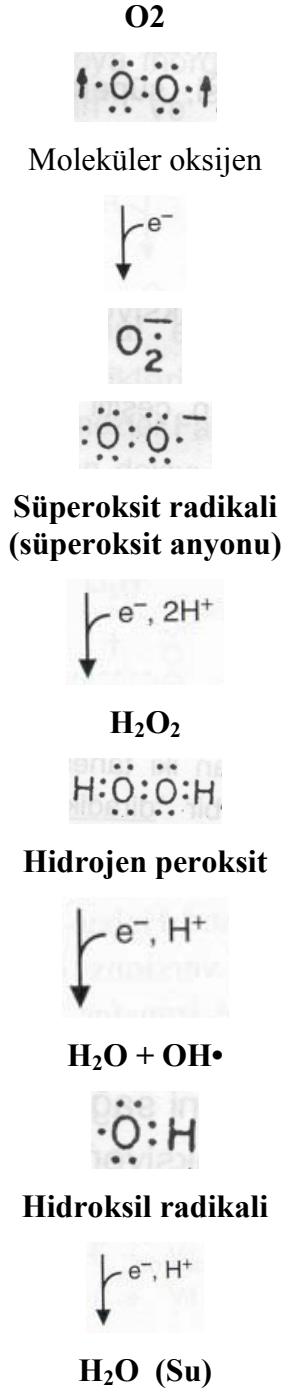
2.3.1.Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Orbitali doldurup stabil hale gelmek için başka elektrona ihtiyaç duyduğundan ortaklanmamış elektronlar serbest radikalleri oldukça reaktif hale getirir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluştuğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır. Yaşam süreleri çok kısa olmasına rağmen, yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif yapıda olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler. Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir³⁷.

Oksijen, dış orbitalde iki tane eşleşmemiş elektronu ile biyolojik sistemlerde önemli bir yeri olan serbest radikaldir. O₂ ile reaksiyona giren moleküllerin oluşturduğu serbest radikaller de biyolojik sistemde önemli bir yere sahiptir²⁶.

Reaktif oksijen türleri

Reaktif oksijen radikalleri; normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan **süperoksit radikali** ($O_2\cdot^-$), **hidrojen peroksit** (H_2O_2) ve **hidroksil radikali** ($OH\cdot$)'dir Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler. Aşağıda serbest radikal oluşumu gösterilmiştir şekil(7) ³.



Şekil 6: Serbest radikal oluşumu (Free radical. Halliway and Gutteridge, 1992)



Şekil 7: Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ⁹⁷

Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir ⁹⁷. Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller **serbest radikal** olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (kasyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler.

Serbest radikal tanımına göre moleküler oksijen, bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilir. Biradikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer ⁴.

Tablo 1: Reaktif oksijen partikülleri ²¹

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit anyon radikali (O_2^-) Hidroksil (HO^\cdot) Peroksi(ROO^\cdot) Alkoksil (RO^\cdot) Nitrik oksit(NO^\cdot) Semikinon radikali (HQ^\cdot) Hemoproteine bağlı serbest radikaller Organik radikaller (R^\cdot) Organik peroksit radikali ($RCOO^\cdot$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2) Singlet oksijen ($*O_2$) Ozon (O_3) Hipokloroz asit ($HOCl$) Lipit hidroperoksit ($LOOH$) Peroksinitrit ($ONOO^\cdot$) Azot dioksit (NO_2) N-halojenli aminler ($R-NH-X$) Hi Hipohalöz asit (HOX)

Moleküler oksijen her aşamada indirgenerek yukarıda tanımladığımız reaktif O_2^- metabolitlerinin oluşumuna yol açar. O_2^- tek başına hücre yıkımına neden olan reaksiyonları başlatabildiği gibi, esas olarak daha reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna da yol açarak hücre toksisitesinde rol oynamaktadır ²⁶.

Reaktif oksijen metabolitlerinden en sık karşılaşılanlar şunlardır.

2.3.1.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu, süperoksit radikali oluşumuna neden olur. Süperoksit radikalının kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ⁹⁷.

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz aracılığı ile hidrojen peroksit'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir ³².

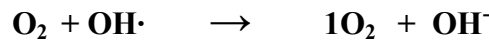
Ortamda biriken süperoksit radikallerinin girebileceği başlıca tepkimeler aşağıdaki gibi özetlenebilir ^{38,87}.

1. Ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali (HO_2^{\cdot}) oluşturabilir.

2. H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali (OH^{\cdot}) ve singlet oksijen (1O_2) oluşturabilir.

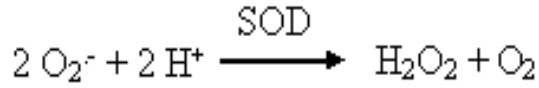


3. Hidroksil radikali ile tepkimeye girerek singlet oksijen yapımına neden olur.



Serbest radikallere karşı organizmanın uzun süreli korumasız kalması bu maddelerin düşük konsantrasyonlarında bile biyolojik açıdan önemli moleküllerin tahribatı ile sonuçlanır ve sonuçta DNA' da mutasyona, doku tahribatına ve hastalıklara yol açar ^{26,97}.

SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksite dönüşümünü katalize eden önemli bir enzimdir.



2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni şu şekilde oluştururlar:



2. Oksijen iki elektronla indirgenmesi sonucu H₂O₂ ortaya çıkar.

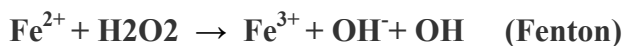


Bu reaksiyon; radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden, dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen radikali (ROR) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. H₂O₂ geçiş metallerinin varlığında en önemli serbest oksijen radikali olan OH· radikalinin oluşumunu sağlar. H₂O₂'nin diğer önemli bir görevi de hücre içi sinyal molekülü olarak görev almasıdır. H₂O₂ oluştuktan sonra katalaz, glutatyon peroksidaz ve peroksiredoksinler adında üç enzim sistemi tarafından uzaklaştırılırlar²⁶.

2.3.1.3. Hidroksil Radikali (OH·)

Hidroksil biyolojik sistemlere diğer ROS' lardan daha fazla hasar veren, biyomoleküllerle reaksiyona girebilen güçlü bir radikaldir. Oluşması için ortamda geçiş metalleri gereklidir. Şu yollarla oluşabilir⁸⁷.

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





2. Katalize olmayan Haber Weiss reaksiyonunda ise, süperoksidin direk olarak hidrojen peroksitle reaksiyona girmesiyle oluşabilir ²⁶.



Hidroksil radikali, Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen radikallerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS•), karbon merkezli organik radikaller (R•), organik peroksitler (RCOO•) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur ⁹⁷.

2.3.1.4. Singlet O₂ (¹O₂)

Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronlarını değiştirerek aynı veya farklı orbitale yerleşebilirler. Uyarılmış haldeki bu oksijene singlet oksijen denir. Reaktif olmayan ancak reaktif oksijen radikallerinden biri olan singlet oksijenin sigma ve delta diye iki tipi vardır ^{26,86}. Sigma formu çok enerjik olduğundan yarı ömrü kısadır, hızlıca bozularak delta formuna dönüşür ⁸⁶.

Singlet oksijen radyasyon sonucu oluşabileceği gibi *invivo* olarak sitokrom P-450, prostaglandin endoperoksit sentetaz ve miyeloperoksidaz reaksiyonlarıyla da oluşabilmektedir. Karotenler, bilirubin, histidin, methionin, 2-5 difenilfuran, 1,4 diazbisikloalefan, singlet oksijeni temizleme görevi yaparlar. Singlet oksijen, DNA, RNA, proteinler, lipitler ve sterollerini kapsayan çok sayıda biyolojik hedeflerle reaksiyona girerek hücrede zararlı etkilere sebep olur ⁸⁶.

2.3.1.5. Hidroperoksil Radikali (HO₂•)

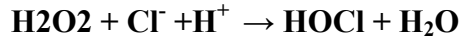
Süperoksit ve hidroperoksil relatif konsantrasyonları ortamdaki H⁺ konsantrasyonu üzerine dayanır. Çeşitli biyokimyasal ve inflamatuvar reaksiyonlar sonucu oluşumu önemli derecede artan süperoksit, asidik ortamda daha reaktif bir radikal olan hidroperoksile çevrilir. HO₂- nin dismutasyon hızı yüksek olduğu için H₂O₂ oluşumu da büyük oranda artar ⁹⁸.

Hidroperoksil radikalinin lipitte eriyebilirliği süperoksite göre daha fazladır ve daha kuvvetli bir oksidandır. Ayrıca hidroperoksil radikali asidik pH da süperoksite göre 108 kat daha hızlı olarak H_2O_2 'e dönüşür⁹⁸.

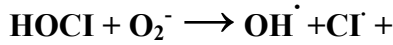
2.3.1.6.Hipokloröz Asit (HOCl)

Hipokloröz asit de radikal olmadığı halde ROT arasında yer almaktadır. Fagositik hücrelerce bakterilerin öldürülmesinde önemli rol oynar. Aktive olan nötrofiller, monosit ve makrofajlar, eozinofiller O_2^- -üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofiller içerdikleri myeloperoksidaz enzimi aracılığıyla O_2^- 'in dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirilerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'e dönüştürür⁸⁸:

Myeloperoksidaz:



Hipokloröz asit Fe^{+2} bağımlı ve Fe^{+2} bağımsız bir reaksiyon ile OH^\cdot oluşumunu arttırabilir⁴¹.



2.3.2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir. Serbest radikaller vücut dışından gelebileceği gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu olarak da oluşabilmektedir. Serbest radikallerin endojen olarak üretimi farklı yollarla gerçekleşmektedir. Buna karşılık, canlı organizmalar da serbest radikallerin potansiyel yıkıcı etkilerine karşı kendilerini savunmak için çeşitli mekanizmalara sahiptir⁴⁸.

Serbest radikallerin endojen ve eksojen kaynakları olup, hücrel metabolizma sırasında sürekli olarak üretilmektedir. Mitokondrial elektron transport zinciri, oksidan enzimler (ksantin oksidaz, siklooksijenaz), fagositler, nötrofiller, FeP^{+2} ve epinefrin'nin hücrel otooksidasyonu endojen kaynaklar olup, okside ilaçlar (CCIB4B, asitaminofen), sigara, radyasyon, glutasyonu oksidize eden maddeler ise eksojen kaynaklardır⁵⁰.

2.3.2.1. Endojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları

2.3.2.1.1. Otoksidasyon

Otoksidasyon, atmosferik oksijenin katalizlediği tipik bir serbest radikal zincir reaksiyonudur. Serbest radikallerin oksijenle reaksiyonu oldukça hızlıdır ve bu reaksiyonların başlangıcı için birçok mekanizma tanımlanmıştır. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve fosfolipidler otoksidasyona eğilimlidir. Otoksidasyonda ilk oluşan ana ürünlerin hidroperoksit (ROOH) ürünleri olduğu düşünülmektedir^{48,84}.

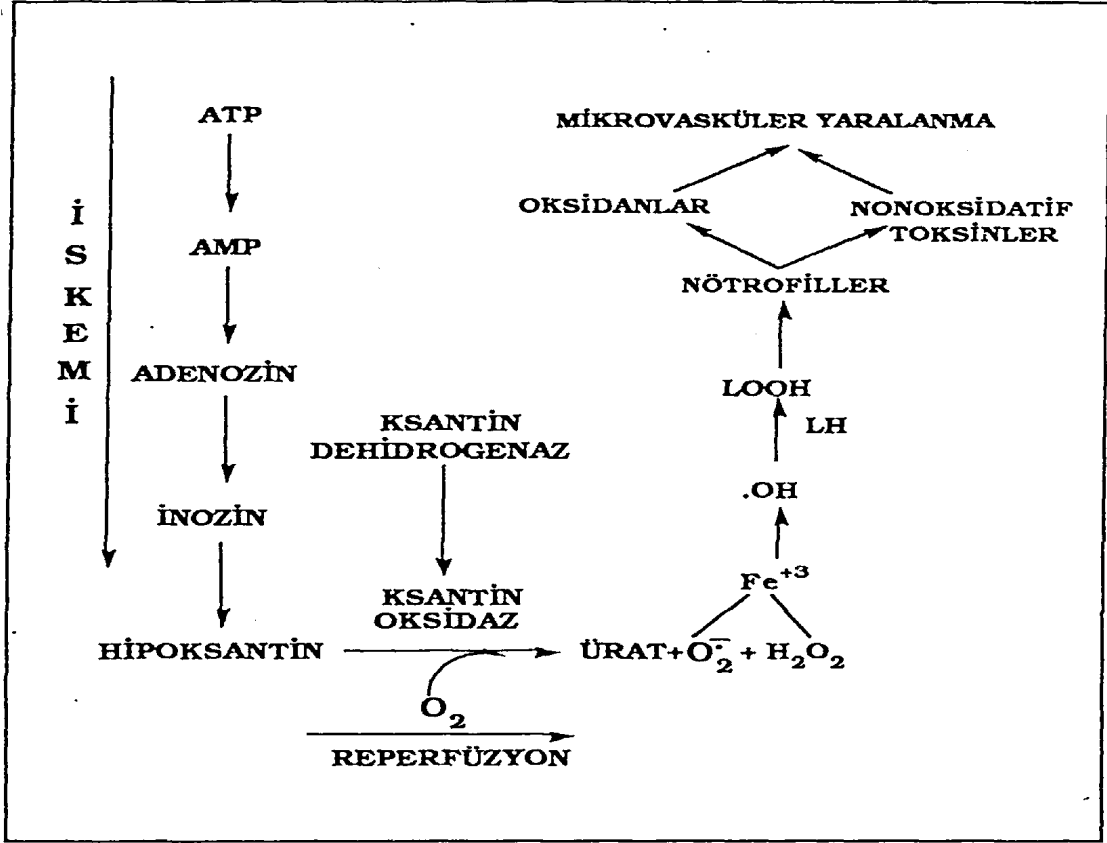
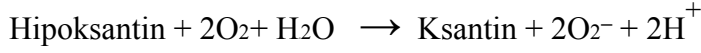
2.3.2.1.2. Mitokondrial Elektron Transport Sistemi

Mitokondrial elektron transport zinciri; normal şartlarda hücrel metabolizmada serbest radikaller üretilmektedir. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP üretimi için moleküler O_2^- suya dönüşür. Fakat O_2^- 'nin %1-5'i bu yoldan kaçarak serbest oksijen radikallerinin olduğu başka biyokimyasal yollara katılır. Ayrıca mitokondrial elektron transport zinciri ve otoksidasyon da serbest radikal üretimine katkıda bulunur. İç mitokondrial membranda yer alan elektron transport enzim kompleksi H_2O_2 üretirken, ubiquinone-cytochrom b bölgesi O_2^- üretiminden sorumludur. Mitokondrial solunum arttığında serbest radikal üretimi de artmaktadır. Ayrıca hipokside olduğu gibi terminal sitokrom azaldığında da mitokondrial elektron transport zincirinde O_2^- üretimi artmaktadır^{49,81}.

2.3.2.1.3. Ksantin Oksidaz (XO)

Ksantin Oksidaz canlı sistemde ROS oluşturan başlıca enzimatik kaynaklardan biridir. XO, pürin katabolizmasında bir ara bileşik olan hipoksantini önce ksantine daha sonra da ürik aside okside ederken NAD^+ 'ye elektron transferini gerçekleştiren bir dehidrogenaz enzimi olmasına karşın, dokuda belli stres koşulları altında tiyol gruplarını okside eden ve proteolizise neden olan bir oksidaz enzimine dönüşür. XO'ın faaliyeti sonucunda süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri oluşmaktadır. Ksantin oksidazın beyinde ödem, iskemi, damar geçirgenliğinde değişkenlik gibi oksidatif hasarlara neden olduğu ayrıca hepatit ve beyin tümörü vakalarında da XO'ın serum düzeylerinin arttığı aktarılmaktadır⁴⁸.

Sitoplazmik bir enzim olan ksantin oksidaz purin metabolizması sırasında O_2 'nin indirgenmesi ile O_2^- üretir⁸¹.



Şekil 8. Ksantin oksidaz sisteminin radikal oluşturma mekanizması²³.

2.3.2.1.4. Araşidonik Asit Kaskatı

Plazma membranında araşidonik asitin prostoglandin, tromboksan ve lökotriene dönüşümünden sorumlu olan lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimler yer alır. Bu reaksiyonlar sırasında serbest yağ asidi radikalleri oluşur⁵⁰. Membran fosfolipidlerinin parçalanması sonucu serbest yağ asitleri oluşur. Serbest yağ asitlerinin en önemlisi araşidonik asittir. Araşidonik asit, serbest radikallere, prostoglandinlere ve lokotrienlere metabolize olabilir. Bu maddeler, nötrofillerin endotelyuma adhezyonunu arttırarak, iskemi reperfüzyon hasarının oluşmasında etkili olurlar²⁶. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine "enzimatik lipid peroksidasyonu" denir⁹⁷.

2.3.2.1.5. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik ve nükleer membranlar serbest radikal üretiminde rol alan diğer hücresel yapılardır. Bu membranlarda, yağ asitlerini oksidize ederek serbest radikal üreten sitokrom p-450 sistemi bulunmaktadır⁵⁰. Endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P-450 O₂ kullanarak birçok substratı oksitler. O₂'nin 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 aktivasyonudur⁴⁷.

2.3.2.1.6. Peroksizom

Peroksizomlar çok önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar, süperoksit üretmeden bol miktarda hidrojen peroksit üretimine neden olurlar. Ancak peroksizomlarda, hidrojen peroksidin suya ayrışmasını katalizleyen katalaz enziminin aktivitesi de çok yüksek olduğundan peroksizomlardan sitozole ne kadar hidrojen peroksit geçtiği bilinmemektedir⁴⁰.

2.3.2.1.7. Plazma Membranı

Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ve lipid peroksit radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir^{3,4}.

2.3.2.1.8. Redoks Döngüsü

Hücre içinde pek çok çözünür sitozolik moleküller oksidasyon-redüksiyon reaksiyonuna uğrar. Tioller, hydroquinonlar ve katekoller redoks reaksiyonuna girerek O₂⁻ P üretimini sağlarlar. Tiol ve askorbat ise Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye indirger. Fe⁺²P'nin otooksidasyonu sırasında O₂⁻ oluşur. O₂⁻ 'nin spontan dismutasyonu ile de H₂O₂ meydana gelir⁵⁰.

2.3.2.1.9.Fagositoz

Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Fagositik lökositler opsonize mikroorganizmalar, C5a kompleman fragmanı, lökotrien B⁴, bakteriyel orijinli N-formil oligopeptitler gibi partiküler ya da çözünebilir bir uyarıcıyla uyarıldıklarında lizozomal komponentleri dışarıya vermeye başlarlar ve reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuyla birlikte mitokondri dışında oksijen tüketiminde bir patlama (solunumsal patlama) gösterirler. Fagosite edilmiş bakteri, solunumsal patlama ürünlerinin etkisiyle öldürülür. Ancak bu oksidan ürünler hücrelerin antioksidan savunma güçlerini aştığında normal konak hücrelere zarar verirler^{3,4}.

Fagosit kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünosupresif ve mutajenik etkiler gösterirler. Fagositlerin uyarılması, heksoz monofosfat şantı yoluyla glukozun oksidasyonunda artışa yol açar. Solunumsal patlama sırasında elektron vericisi olarak NADPH kullanılır ve moleküler oksijenin süperoksit radikaline indirgenmesi sonucu NADP⁺ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur. Heksoz monofosfat yolunun aktivasyonuna neden olan NADP⁺'nin diğer kaynağı hidrojen peroksidin detoksifikasyonundan sorumlu olan glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemidir. Nötrofiller ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde Fe-hem içeren miyeloperoksidaz enzimi bulunur. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle fagositler miyeloperoksidaz içeren granüllerini ekstrasellüler aralıktaki fagositik vakuol içine boşaltırlar. Miyeloperoksidaz, hidrojen peroksit varlığında klorür, iyodür ve bromürün oksidasyonunu katalizleyerek hipoklorik asit (HOCl), hipoyodik asit (HOI) ve hipobromik asit (HOBr) oluşturur. Bu bileşikler ve bunların tuzları güçlü oksidanlardır, bunlar biyolojik olarak önemli moleküllerle reaksiyona girerek mikroorganizmayı etkileyen toksik ajanlar meydana getirirler^{3,4,52}.

Tablo 2 : Fagositlerin ürettiği bazı reaktif oksidan ürünler

Trombositler	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{·-} , OH [·]
Eozinofiller	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{·-} , OH [·] ,HOCl
Makrofajlar	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{·-} , OH [·] ,HOCl ,NO [·]
Nötrofiller	H ₂ O ₂ , O ₂ ^{·-} , OH [·] ,HOCl

Fagositin kendisi de reaktif oksidanların zarar vermelerine karşı hassastır. Bununla birlikte kendilerini oksidanlarına karşı koruyabilirler. Fagositlerin antioksidan sistemleri, süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren süperoksit dismutaz hidrojen peroksidi suya indirgeyen katalaz, hidrojen peroksidi detoksifiye edici glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemi, antioksidan vitaminlerden α -tokoferol (vitamin E) ve askorbik asit (vitamin C) gibi antioksidanlardır^{3,97}.

2.3.2.2. Eksojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizması

Eksojen serbest radikaller, Çok doymamış yağ asitlerince beslenme, alkol, fazla kalorili beslenme (obesite), hayvansal proteinlerce zengin beslenme, Sigara dumanı, hava kirliliği (O₃, NO₂, SO₂, Hidrokarbonlar), radyasyon diğer kirlleticiler (asbest, pestisitler, vs.) ve antikanser ilaçlar gibi eksojen nedenlerle de oluşabilir^{37,87}.

2.3.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin etkileri hücre içi ve hücre dışı etkiler olmak üzere iki başlıkta incelenebilir.

2.3.3.1. Hücre İçi Etkileri

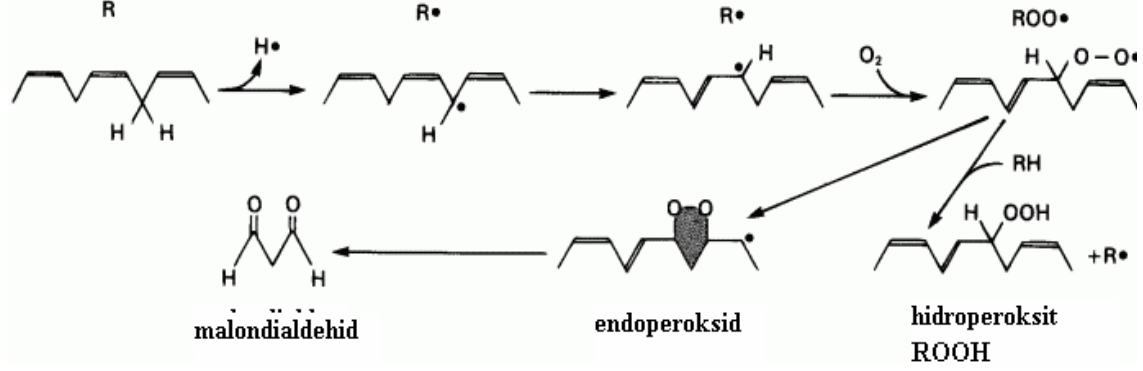
2.3.3.1.1. Lipit Peroksidasyonu

Biyolojik moleküllerin hepsi serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler serbest radikal hasarından en fazla etkilenen biyomoleküllerdir. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin ve kolesterolün oksidatif hasarlanmasına lipit peroksidasyonu denilmektedir. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür⁵³.

Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri ve lipit peroksit radikallerinin oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir. Hücre membranlarında lipit peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre (çoklu doymamış) yağ asitleridir. Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipit radikali (R[•]) dayanıksız

bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin (R^\bullet) moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (ROO^\bullet) oluşur⁹⁷.

Lipid peroksit radikalleri membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($ROOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder⁹⁷.



Şekil 9: Lipid peroksidasyonu sonucu MDA oluşumu (Mechanisms of Aging, 2006)

Lipid peroksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehytlar oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit meydana gelir. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehytlarla indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur^{3,4}.

Lipit Peroksidasyonu'nun Organizmadaki Bazı Etkileri;

- Lipit peroksidasyonu sonucu membran akışkanlığı azalır ve normalde hücre içine geçemeyen maddelerin hücre içine girişleri artar.
- Hücre membranına yakın yerleşimdeki DNA molekülleri de lipit peroksidasyonundan hasar görürler ve bazen DNA'nın replikasyonu yapılamaz.

- Lipit peroksitler ve alkoksil radikaller, triptofan ve sistein gibi protein kısımlarına ataklar yaparak protein yapısını bozar ve hasar meydana getirirler.
- Bazı aldehitler biyolojik sıvılarda kemotaktik etki gösterirler.
- MDA gibi aldehitler, LDL' yi modifiye ederek metabolik yolu değiştirebilirler

54

2.3.3.1.2. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir^{4,55}.

2.3.3.1.3. Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Okzoaldehitler DNA, ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olayında rol oynarlar³.

2.3.3.1.4. Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerine göre daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali veya hidrojen peroksitle reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur⁹⁷.

2.3.3.2. Hücre Dışı Etkiler

2.3.3.2.1. Kemotaksi

Serbest radikaller, kemotaktik faktör ya da proinflamatuvar moleküller olarak adlandırılan endotel hücrelerden olan histamin, platelet aktive edici faktör (PAF),LTB4 salınımına yol açarlar. Böylece bu kemotaktik faktörlerin etkisi, dolaşımda bulunan lökositlerin patoloji bölgesinde yoğunlaşmalarını ve endotel ile ilişkilerinin artmasını sağlar⁴¹.

2.3.3.2.2. Rolling

Normal koşullarda dolaşımdaki lökositler, damar endoteli ile nadiren temasta bulunurlar. Endotelin, iskemi reperfüzyonu ile oluşan radikaller tarafından uyarılması sonucu lökositler ve özellikle de nötrofiller, kendi etraflarında yuvarlanmaya başlarlar. Bu 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. Yuvarlanma olayı bu L,P ve E selektinlerin etkileşimi sonucu lökositlerde gerçekleşmektedir⁴¹.

2.3.3.2.3. Antiadhezyon molekülleri İnhibisyonu

Kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen endotel hücreleri İ/R'ın zararlı etkilerine karşı oldukça hassas bir yapıya sahiptirler. Uzamış hipoksinin membran potansiyelini değiştirdiği, iyon dağılımını bozduğu, hücre içi hacmi arttırıp membran akışkanlığını azalttığı ve endotel hücrelerinin yapısal düzenini bozduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bu değişikliklere enerji depolarının tükenmesi, prostasiklin, nitrik oksit (NO) gibi bazı biyoaktif ajanların üretiminde azalma ve endotelin, tromboksan A₂ üretiminde artma eşlik eder. Benzer şekilde hipoksik endotel hücrelerinde bazı genler uyarılırken (örn. adezyon molekülleri ve sitokinler), diğerleri (örn. nitrik oksit sentaz ve trombomodulin) baskılanır. Endotel hücrelerinin hipoksiye yanıtları reperfüzyon ile arttırılır⁵⁶.

Serbest oksijen radikalleri, NO'ı inhibe ederler. NO, kararsız bir nitrat bileşimidir. Damarlarda gevşemeye sebep olması, ilk tesbit edilen fonksiyonu olmakla beraber organizmada birçok biyolojik olayda görev alır. Kas, deri, barsak ve kalp gibi birçok organ sisteminde var olduğu bilinmektedir. Endotel hücreleri, lökositler gibi

pekçok hücreden salınabilir. NO, lökosit endotel adhezyonunu önleyen en önemli endojen moleküldür. Ancak NO salınımı, reperfüzyon hasarı sürecinde ortaya çıkan süperoksitin, endotel hücrelerine etkisi ile inhibe olur⁵⁷.

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 başlatırlar⁵⁸.

2.4.ANTİOKSİDANLAR

2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Serbest radikaller, organizmada normal metabolik yolların işleyişleri sırasında sürekli oluşan ve endojen antioksidanlar adı verilen moleküller tarafından etkisizleştirilen maddelerdir. Oksidan moleküller belirli düzeyde kaldıkları sürece, organizmanın yabancı maddelere ve infeksiyon ajanlarına karşı önemli savunma molekülleridir. Ancak belirli düzeyin üzerinde oluştuklarında veya antioksidan sistemin yetersizliğinde serbest radikal molekülleri, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asitler ve enzimleri bozarak zararlı etkilere yol açarlar⁵⁹.

Hücrede oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonu özellikle daha çok enzimatik mekanizmalarla gerçekleşir. Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını O₂ radikalini ve H₂O₂ temizleyen özel enzimler oluşturur. Bunlar radikal süpürücü olarak adlandırılan SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz enzimleridir⁶⁰.

2.4.1.Antioksidan etki tipleri

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucunda antioksidanlar başta lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir^{21,101}.

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

1) Toplayıcı etki: Reaktif oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme şeklindedir. Antioksidan enzimler bu tip etki gösterirler.

2) Bastırıcı etki: Reaktif oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme şeklindedir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Zincir kırıcı etki: Reaktif oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Onarıcı etki: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklindedir

2.4.1.1. Doğal Antioksidanlar (Endojen)

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler. Eksojen antioksidanlar, vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler. Endojen antioksidanlar ise enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır ^{4,3,55}:

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

Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır ^{4,3,55}:

- 1) Melatonin
- 2) Seruloplazmin
- 3) Transferin
- 4) Miyoglobin
- 5) Hemoglobin
- 6) Ferritin
- 7) Bilirubin
- 8) Glutasyon
- 9) Sistein
- 10) Metiyonin
- 11) Ürat

- 12) Laktoferrin
- 13) Albümin

2.4.1.2. Eksojen Antioksidanlar

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar şunlardır ^{4,3,55}:

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

2.4.1.3. Gıda Antioksidanları

Gıdalardaki eksojen antioksidanlar şunlardır ^{4,3,55}:

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

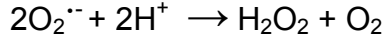
Vitamin eksojen antioksidanlar ^{4,3,55}:

- 1) α -tokoferol (vitamin E)
- 2) β -karoten(vitamin A)
- 3) Askorbik asit (vitamin C)
- 4) Folik asit (folat)

2.4.2. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.2.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur, süperoksidin H₂O₂ dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir. SOD süperoksit serbest radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü aşağıdaki reaksiyonla katalizleyen antioksidan enzimdir ^{41,104}.



Serbest radikallere karşı organizmada ilk savunma SOD enzimi ile gerçekleşir. SOD, O₂'radikalini metabolize eder ve daha zararlı olan hidroksil radikalinin oluşumunu engeller.

O₂'radikalini H₂O₂'ye ve moleküler O₂'ye dönüştürür. Tepkime ürünü olan H₂O₂ tarafından inhibisyona uğrar ⁶¹.

SOD enzimi metalloprotein yapısındadır. Hücrelerde farklı şekillerde bulunmaktadır. Bunlar:

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

SOD-2:Mn-SOD, mitokondride bulunur.

SOD-3 :Fe-SOD, Bazı bakterilerde rastlanmıştır.

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

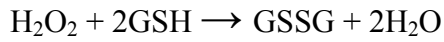
İnsanlarda ise SOD enzimi: Sitozolik Cu/Zn-SOD; mitokondrial Mn-SOD; plazma, lenf ve sinovyal sıvılarda bulunan ekstrasellüler SOD olmak üzere 3 formda bulunur ⁴¹.

SOD, O₂'molekülleri ile spontan olarak dismutasyona uğrayabilir. Sulu ortamda kendiliğinden ve hızlı bir şekilde dismutasyona uğrayarak O₂ ve H₂O₂ oluşturur. SOD varlığı dismutasyon hızını 10⁴ kat artırır. Böylece O₂'radikalinin potansiyel substratla reaksiyona girmesi ve OH[·] gibi daha toksik ürünlerin oluşması SOD tarafından önlenmiş olur. Organizmada oksidatif stresin ve dokuda pO₂'nin arttığı durumlarda SOD enzim aktivitesi artmaktadır.

Hidrojen peroksit, Fenton reaksiyonu veya Haber-Weiss reaksiyonları ile çok daha reaktif olan OH[·] radikali oluşturabilir. Oluşan H₂O₂'e karşı ikinci savunma CAT ve GPx enzimleriyle sağlanır ⁵⁹.

2.4.2.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon sistemi, oksidatif hasarın azaltılmasında rol oynayan, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonuna neden olan ve lipit peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen mekanizmalardandır. İntrasellüler glutasyon olarak bulunan en güçlü tiol bileşiğidir. GPx enzimi, glutasyondan ayırarak H₂O₂'yi suya dönüştürür, selenyuma bağlı sitoplazmik bir enzimdir, H₂O₂'yi detoksifiye ederek su ve okside glutasyona dönüştürür⁶².



GPx'in antioksidan aktivitesini göstermesi, hücre içinde yeterli konsantrasyonda glutasyon redüktaz, GSH ve nikotinamid adenindinükleotid bulunmasına bağlıdır⁶².

Glutasyon peroksidaz sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Ayrıca Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen bir enzim monomerik yapıdadır ve esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.



Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. GSH-Px'in fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler³.

2.4.2.3. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz, bir flavin enzimdir, hem sitozolde hemde mitokandride bulunur, koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD'dır. GSH-Px vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutasyona (GSH) dönüşümünü şu şekilde katalize eder^{3,63}.



Şekil 10: İskemide glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktazın rolü (Cerrahpaşa J Med 1998).

2.4.2.4. Glutatyon-S-Transferaz (GST)

Glutatyon S-transferazlar, her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Bunlar hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir. GST, başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GSH-Px aktivitesi göstererek bir antioksidan savunma mekanizması gösterir. GST'ler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Bunlar hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. GST'ler, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizlerler³.

GST ailesi ayrıca ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere karşı GST'ler GSH-Px aktivitesi gösterirler⁴¹.

GST

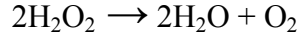


Glutatyon-S-transferazlar, glutatyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlarlar⁴¹.

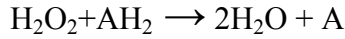
2.4.2.5. Katalaz (CAT)

Katalaz 60 kDa ağırlığında 4 tane aynı yapıda (tetramerik yapıda) hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak, katalaz enzimi bir molekül hidrojen peroksidi elektron verici bir substrat olarak, diğerini ise oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir^{3,25}.

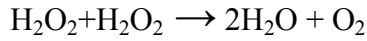
CAT



Katalaz enzimi peroksizomlarda yerleşmiş olup kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Katalaz önemli bir aktivite olarak düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda ya da ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğunda peroksidatif tepkime ile hidrojen peroksidi suya dönüştürür.



Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise aşağıdaki katalitik tepkimeyle H_2O_2 yi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmış olur¹⁰⁴.



2.4.3. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

2.4.3.1. E Vitamini (α -tokoferol) ve C vitamini (Askorbik asit)

Vitamin E çok güçlü bir antioksidandır, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur⁵². Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka bu moleküle antioksidan özellik kazandırır⁶⁴. Vitamin E süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Vitamin E zincir kırıcı antioksidan olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu, vitamin E vasıtasıyla şu yolla sonlandırılabilir: Vitamin E okside olduktan sonra ve parçalanmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilmektedir. Vitamin E ve C verilmesinin, yaşlı kişilerde ortalama kan lipid peroksit konsantrasyonlarında bir azalma sağladığı saptanmıştır. Glutatyon peroksidaz ile vitamin E, serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Glutatyon peroksidaz oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken vitamin E peroksitlerin sentezini engeller⁵².

Vitamin C organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev yapar ayrıca Kollajen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Tirozinden epinefrin sentezinin dopamin β -hidroksilaz basamağında görev alır. Tirozin yıkılımında p-hidroksi fenil pirüvatın homogenizata oksidasyonunda rol alır. Safra asitlerinin sentezindeki 7- α -hidroksilaz başlangıç basamağında rol alır.

Lizinden karnitin sentezinde rol alır. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici olarak rol oynar, midede ferri demiri ferro demire indirger. İmmünite ve yara iyileşmesinde etkilidir ³.

Vitamin C, güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler. Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali oluşturmaya uygun ferro demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir. Vitamin C'nin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir ³.

2.4.3.2. Karotenoidler (B Karoten)

Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır ³.

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, lipid membranlara lokalize olarak membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltır ⁶⁵.

2.4.3.3. Glutatyon (GSH)

Glutatyon karaciğerde genetik bilgiye ihtiyaç olmadan sentezlenebilen, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan güçlü bir antioksidan ve bir tripeptittir. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur ^{52,66}.

Organizmada temel olarak; peroksidaz aracılı peroksitlerin katabolize edilmesi, hücresel tiyol ve redoks potansiyelinin düzenlenmesi, Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki

sülhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH; yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar ayrıca eritrositleri, lökositleri ve göz lensini oksidatif strese karşı korumada GSH hayati öneme sahiptir ^{52,66,67}.

2.4.3.4. Ürik Asit (Ürat)

Normal plazma konsantrasyonunda ürat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler. Ürik asit ksantin oksidaz 'ın oksipürünleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi sonucu oluşur. İnsan ve gelişmiş primatlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır. Fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Bilirubin süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır. Ayrıca albümin lipit hidroksiperoksitleri ve HOCl toplayıcısıdır. Bu görevlerde ürik asitin antioksidan etkilerinin olduğunun göstergesidir ^{3,68}.

2.4.3.5. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) en zararlı radikal olan hidroksil radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Bu yüzden günümüzde antioksidanların en güçlüsü kabul edilir. Melatonin antioksidanın diğer bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin diğer organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan- beyin bariyerlerini de kolayca geçebilir. Böylece geniş bir dağılımla antioksidan etki gösterir. Melatoninin hücre çekirdeğine girebilmesi onun DNA'yı oksidatif hasardan koruması bakımından diğer oksidanlara göre daha üstün bir özellik kazandırır. DNA hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Yaşlanma ile melatonin üretiminde azalır ki bunun da yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli rolü olabileceği kaydedilmiştir ^{3,69}.

Melatonin pineal bez tarafından üretilir. Melatonin biyosentezinde başlangıç maddesi pineal bez tarafından aktif transportla plazmadan alınan ve bir indol amino asit olan triptofandır. Triptofan esansiyel bir aminoasit olup dışardan alınması gereklidir, pineal bez tarafından aktif transportla plazmadan alınır ⁷⁰.

2.4.3.6. Seruloplazmin

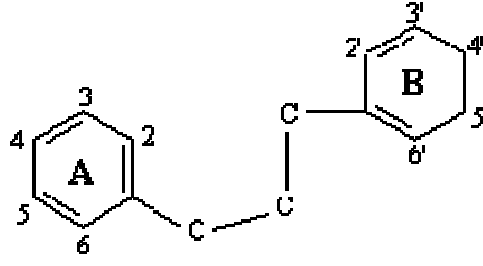
Seruloplazmin olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri (Fe^{+2}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe etmektedir³.

2.4.3.7. Flavonoidler

Biyolojik sistemlerdeki aerobik metabolizma bazal koşullarda bile prooksidanlar olarak bilinen reaktif oksijen ürünlerini oluşturur¹. DNA, lipidler, proteinler gibi biyolojik moleküllerin prooksidan hasarına karşı koymada endojen ve eksojen kaynaklı antioksidanlara gereksinim vardır. Eğer prooksidanlar çok fazla oluşursa oksitatif stres ya da oksitatif hasar meydana gelir. İnsanlardaki birçok hastalık (kanser, kardiyovasküler düzensizlikler vb.) prooksidan hasara eşlik eder. Bu hastalıkların antioksidanlar tarafından önlenmesi konusu son yıllarda tıbbi literatürde öneerli bir yer tutmaktadır. Antioksidanlar etkilerini ROS 'nin oluşumunu önleyerek ve/veya ROS'ni temizleyerek gösterirler, Eksojen kaynaklı antioksidanların birçoğu bugün yaygın olarak kullandığımız gıdalarda mevcuttur.

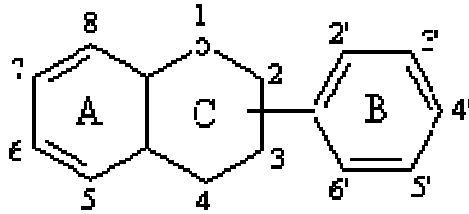
Bunlar; bazı vitaminler, flavonoidler, polifenoller, ve diğer bileşikleri kapsamaktadır. Flavonoidler yıllar önce araştırılmaya başlanmasına rağmen son yıllarda önem kazanan çalışmalar flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında antiinflatuvar, antiviral, antiallerjik, antitrombotik ve diğer özelliklerinin de bulunduğunu göstermektedir. Sayıları 4000' in üzerinde olduğu tahmin edilen flavonoidler çay, elma, soğan, baklagiller, domates ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır^{71,72}.

Sarı renkli olmaları nedeniyle latince 'sarı anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoid' adını almışlardır, 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı ($C_6-C_3-C_6$) gösterirler. Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak kabul edilirler. İskelet yapılarının farklı oluşuna göre lavon, flavonol, flavonon, biflavonoid, kalkon gibi türleri vardır. Flavonoidleri P vitamini olarak kabul eden görüşler mevcuttur^{72,73}.



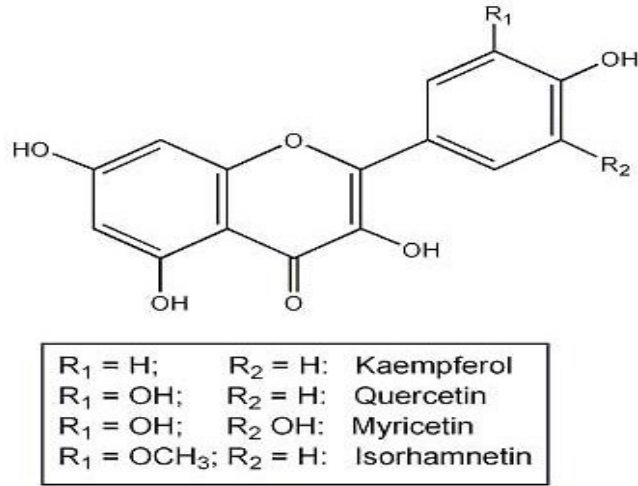
Şekil 11: C₆-C₃-C₆ sistemi, benzen halka yapısının birleşimi

Flavonoidler bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan bileşiklerdir, bitkilerin ikincil metabolitlerindedir. Yaşamsal gereksinimleri için kullandıkları karbonhidratlar, aminoasitler gibi birincil metabolitlerden türerler. Fenil benzopiran yapısı A, B, C halkalarından meydana gelmiştir. A halkası glikoz metabolizması sonucu oluşan asetil koenzim A'dan oluşan malonil koenzim A'nın 3 molekülünün kondenzasyonu ile B ve C halkaları ise yine glukoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerinden oluşmuştur. Şekil 2'de görülen fenil benzopiron yapısında numaralarla gösterilen yerlerdeki karbon atomlarına hidroksil (-OH) gruplarının bağlanmasıyla çok çeşitli flavonoidler meydana gelmiştir.



Şekil 12: Flavonoidlerin kimyasal yapısı

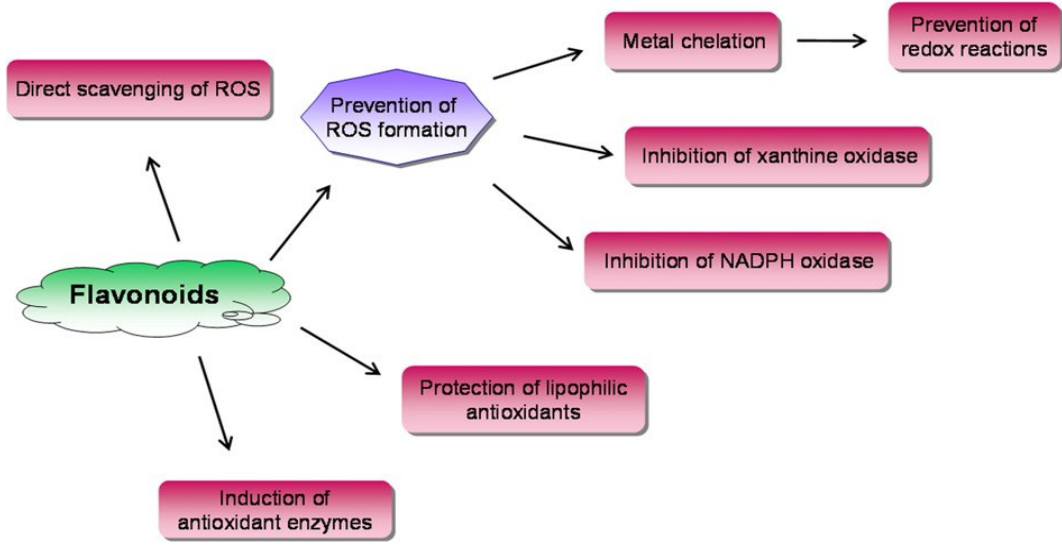
Bazı -OH gruplarına şeker, metil, sülfat ve benzeri grupların konjugasyonu ile de bu flavonoidlerin farklı konjugasyon ürünleri meydana gelmektedir. Örneğin bir flavonol olan quercetin'in 3.C atomuna bağlı -OH grubuna rutinozun konjugasyonu ile oluşan flavonoid rutin olarak adlandırılmaktadır^{71,74}.



Şekil 13: Bazı flavonoller'in kimyasal yapıları ⁷⁴.

Flavonoidler antitoksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidlerin etki mekanizmaları şu şekildedir:

- a) Süperoksit radikali, hidroksil radikalini ve singlet oksijeni temizler.
- b) Peroksil radikalini (ROO·) ve alkoksil radikalini (RO·) yakalar, lipid peroksil (LOO·) zincirini kırar.
- c) Siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzimlerini inhibe eder.
- d) Demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlar.
- e) Enzim fonksiyonlarına bağımlı kalsiyum modinasyonu hücrel regülasyonda önemli bir rol oynayan küçük bir asidik protein olan kalmodülini inhibe eder.
- f) Protein kinaz enzimini inhibe eder.
- g) Laktat transportunu engeller.



Şekil 14: Flavonoidlerin antioksidan etki mekanizmaları. Flavonoidler doğrudan ya da dolaylı olarak ROS (reaktif oksijen ürünleri) süpürücü etki gösterir veya ROS üretimini engelleyen hücrel antioksidan enzimlerin gelişmesine katkıda bulunmaktadır⁹⁹.

Flavonoidlerin serbest radikal yakalama ve antioksidan özelliklerinin yapılarında bulunan üç gruptan ileri geldiği öne sürülmektedir. Bu yapısal gruplar şunlardır:

1. B halkasındaki o-dihidroksi (kateşol) grubu(radikal hedef yeri)
2. C halkasındaki 4-okzo grubu ile 2-3 çift bağı (elektron delokalizasyonu için gereklidir).
3. 3 ve 5 hidroksil grupları (maksimal radikal yakalama ve şatlama için gereklidir).

Bu üç fonksiyonel grubu quercetin üzerinde görebiliriz. Üç grubun hepsine sahip olan flavonoidler maksimum aktivite gösterirken, eksik gruba sahip olanların aktiviteleri daha düşüktür^{71,72,75,76,77,80}.

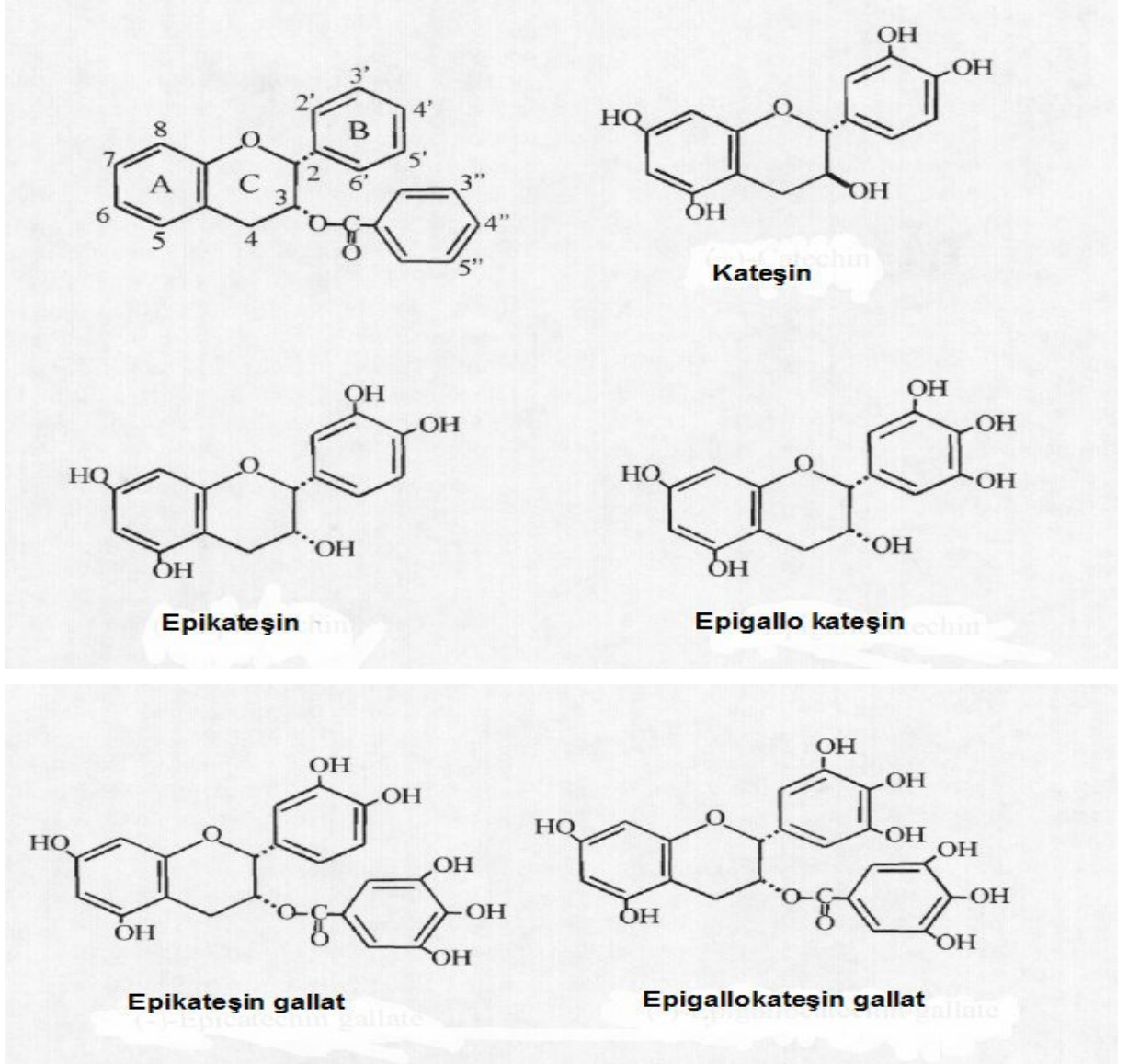
Tablo 3: Flavonoidlerin alt sınıfları ve bazı besinsel kaynakları⁷⁸.

Flavonoid alt sınıf	Diyet Flavonoidler	Bazı Yaygın Gıda Kaynakları
Antiyosiyanidinler	Siyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin, Petunidin	Kırmızı, mavi ve mor meyveler, kırmızı ve mor üzüm, kırmızı şarap
Flavanoller	Monomerler (Kateşinler): Kateşin, epikateşin epigallocatechin epikateşingallat, epigallocatechin gallate Dimerler ve Polimerler: Theaflavin , thearubigin, Proantosiyandinler	Kateşin: Çaylar (özellikle yeşil ve beyaz), çikolata, üzüm, çilek, elma Theaflavin, thearubigin: Çaylar (özellikle siyah ve oolong) Proantosiyandinler: Çikolata, elma, çilek, kırmızı üzüm, kırmızı şarap
Flavanonlar	Hesperetin, naringenin, Eriodictyol	Turunçgiller ve suları, örneğin, portakal, greyfurt, limon
Flavonoller	Quercetin, kaempferol, Myricetin, Isorhamnetin	Yaygın olarak dağıtılan sarı soğan, taze soğan, lahana, brokoli, elma, çilek, çay
Flavonlar	Apigenin, Luteolin	Maydanoz, kekik, kereviz, biber,
İsoflavonlar	Daidzein, Genistein, Glycitein	Soya fasulyesi, soya gıdalar, baklagiller

2.5. Epigallokateşin-3-gallat (EGCG)

Kateşinler yeşil çayda bulunan ana fenolik bileşiklerdir ve flavan-3-ol grubunda yer alırlar. Kateşinler çayın dışında elma, erik, şeftali, çilek, kiraz gibi meyvelerde, fasulye, mercimek gibi sebzelerde, kakao ve kırmızı şarapta bulunur^{82,83}.

Çay yaprağında bol miktarda bulunan polifenollerin yaklaşık $\frac{3}{4}$ 'ünü flavanoller, flavanollerin de % 60-70'ini epigallokateşin-3-gallat oluşturmaktadır²⁵. Çayın antioksidan etkili bileşikleri olan polifenoller kuru çayın %35'ini oluştururlar. Başlıca polifenoller; flavanoller (kateşinler), flavonlar ve fenolik asitlerdir. Hem siyah hem de yeşil çaydaki en önemli kimyasallar ise kateşinlerdir⁷.



Şekil 15.Yeşil çayda bulunan kateşinlerin kimyasal yapısı ⁷⁹.

Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat (ECG) ve epigallokateşin galat (EGCG) hem ilaç etken maddesi olarak ve hem de diyetle oldukça önemli yeri olan flavanollerdir ⁵.

Yapılan çalışmalar, siyah çayın en önemli kateşinlerinin, siyah çaya rengini ve buruk aromasını da veren theaflavinler (TF) ve thearubiginlerin (TB) olduğunu göstermiştir. Siyah çay ve yeşil çayın etken maddelerinin hastalıklara karşı korunmada benzer etkiler gösterdiği belirlenmiştir ^{7,85}.

Epidemiyolojik çalışmalar hem yeşil hem de siyah çayın her yaş grubu için başta koroner kalp hastalıkları, inme, kalp damar hastalıkları, hipertansiyon, mide ve kolorektal hastalıklar, çeşitli kanser türleri, karaciğer rahatsızlıkları ve artrite karşı

koruyucu, ayrıca antiviral ve antiinflamatuvar ve kemik yoğunluğunu düzenleyici etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Hem yeşil hem de siyah çayın, içeriğinde bulunan polifenolik bileşikler nedeniyle antioksidan bir içecek olduğu ve kronik hastalıklardan koruyucu etkisini bu yolla yaptığı belirtilmektedir^{8,9}.

Taze çay filizinde bulunan kateşinler ve oranları (% kuru verim):

- (-)-epigallokateşingallat (EGCG) %9-13,
- (-)-epikateşingallat (ECG) %3-6,
- (-)-epigallokateşin (EGC) %3-6,
- (-)-epikateşin (EC) %1-3.
- Gallokateşin (GC) %3-4
- Kateşin(C) %1-2

Kateşinler yeşil çay yapraklarındaki ana biyoaktif bileşenleri oluşturur ve bir bardak yeşil çayda 100-200 mg kateşin bulunmaktadır⁸⁹.

EGCG plazmada daha çok serbest şekilde, EGC ve EC ise plazma ve idrarda glukronil ve sulfat konjugatları halinde bulunur. Glukronidasyon, sulfasyon ve metilasyon çay katesinlerinin ana biyotransformasyon yollarıdır. Kateşol-O-metil transferaz (KOMT), UDP-glukuronil transferaz (UGT) ve fenolsulfotransferaz (SULT) polifenol metabolizmasında yer alan enzimlerdir. EGCG'nin EGC ve ECG'dan daha az konjuge olduğu, ECG'nin ve EGCG'tan daha çok metillendiği bulunmuştur. Tükürükte kateşin esteraz aktivitesi bulunmuş ve EGCG'nin ağız veya özofagusta gallat grubunun ayrılabilmesi ileri sürülmüştür^{90,91}.

Yeşil çayda bulunan polifenollerin, özellikle EGCG'nin antikarsinogenik etkileri, çeşitli hayvan ve hücre kültürü deneyleri ile gösterilmiştir. EGCG, serbest oksijen radikallerini süpürücü etkileri yanında, glutatyon peroksidaz, gamaglutamilsistein sentaz, kuinon redüktaz, hemoksijenaz enzimlerini düzenleyerek de antioksidan etki göstermektedir. Siklin bağımlı kinazları modüle eder, TNF-a, prostaglandinler (özellikle PGE2) ve interlökin (IL) gibi proinflamatuvar faktörlerin overekspresyonunu inhibe ederek tümör oluşum mekanizmalarını bozar. Bazı kanser türlerinde siklooksijenaz-2'nin (COX-2) overekspresyonu vardır ve EGCG bu ekspresyonu da inhibe etmektedir. Tümör invazyonunda önem taşıyan MMP-2 ve MMP-9'un aktivitelerini de azaltması ile EGCG kanser tedavisi ve kanserden korunma için de ilaç olarak ümit verici görülmektedir^{6,92}.

2.5.1. Quercetin(Q)

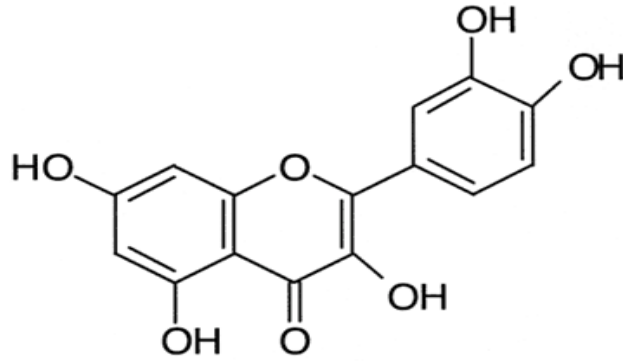
2.5.1.2. Genel özellikleri

Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksil flavon) flavinoid ailesinin önemli bir üyesidir. Bu flavinoid meyve, sebze gibi besinlerde, kırmızı sarap, greyfurt, soğan, elma, siyah çay, ve az miktarlarda yapraklı yeşil sebzelerde ve fasulyede bulunur^{95,13}. Günlük besin ile 50-500 mgr kadar quercetin alınabileceği tahmin edilmektedir. Quercetin, Fe ve Cu aracılığı ile hidroksil radikali oluşumunu önleyerek oksidatif hasara karşı koruma yapan çok güçlü bir antioksidandır. Serbest oksijen radikallerinden ·OH ve singlet oksijen gibi yapıları temizlediği ve ksantin oksidaz ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Deneysel olarak İ/R hasarı oluşturulmuş modellerde de quercetin dokuyu İ/R hasarından koruduğu gösterilmiştir^{10,11,12}.

Biyolojik etkileri sebebi ile ilaç olma potansiyeli olan ve çok sayıda bilimsel çalışmaya konu olan doğal bir maddedir. Ancak 1970'li yıllarda, AMES testi ile, mutajenik olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte yapılan in vitro çalışmalarda bulgular quersetinin mutajenik değil antimutajenik olduğunu göstermektedir. Ulusal Toksikoloji Programı (National Toxicology Program) tarafından yapılan bazı in vivo testlerde ise quersetinin F344 sıçanları üzerine karsinojenik etkileri gözlenmiştir. Ancak yapılan in vivo çalışmaların büyük çoğunluğu, quersetinin karsinojenik olmadığı yönündedir. IARC (International Agency for Research on Cancer), 1969 yılından itibaren karsinojenik risk taşıyan kimyasalları değerlendirme altına almaktadır. IARC, 1999 yılında, quersetinin insanlar için karsinojenik olmadığı sonucuna varmıştır. quersetin, Amerika ve Avrupa'da ticari olarak satılmakta ve devam eden klinik çalışmalarda rapor edilen yararlı etkileri artmaktadır (Okamoto, 2005). quersetin Hsp'lerin (Heat shock proteins, ısı soku proteinleri) ekspresyonunu (özellikle Hsp70), inhibe ederek tümör hücreleri üzerine apoptotik etki gösterir⁹³.

2.5.1.3. Antioksidan özellikleri

Quercetin, antioksidan özellikleri olan bir bitki pigmentidir. Bu pigment, kötü kolesterolün okside olmasını önleyebilir ve hücrelerin kansere dönüşmesini geciktirebilir. Ayrıca quercetin adlı madde çok güçlü bir antioksidan olup kolesterolü düşürmekte, kalp hastalıkları ve akciğer kanseri riskini azaltmaktadır. Akciğerleri ve solunum yollarını sigara ve kirli havanın etkilerinden korumaya yardımcı olduğu saptanmıştır¹³.

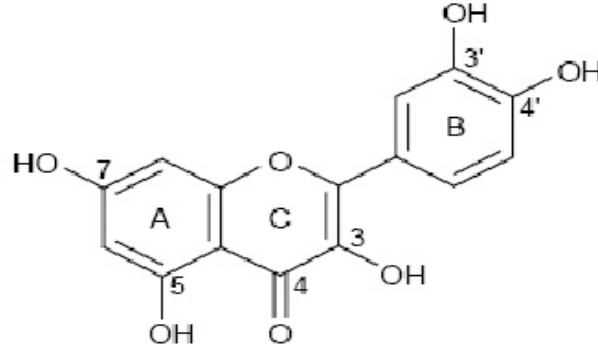


Şekil 16: Quercetin'in kimyasal yapısı¹³.

Flavonoid tüketiminin artması ile koroner kalp hastalığı görülmesi arasında ters bir ilişki vardır. Japonya'da yürütülen bir çalışmada quercetin alımının artmasıyla plazma total kolesterol ve LDL-kolesterol konsantrasyonlarının azaldığı görülmüştür. Finlandiya'daki bir başka çalışmada ise quercetin'den zengin elma ve soğan tüketimi arttığında koroner mortalite azalmış olarak bulunmuştur. Quercetin flavonoidlerin flavon grubunda olup, biyokimya, gıda kimyası, tıp ve ilaç yapımı alanlarında kullanılmaktadır. Genellikle birçok bitkide farklı flavonoidlerle birlikte bulunur^{93,13}.

Quercetin'in diğer flavonoidlere göre antioksidan etkinliği oldukça güçlüdür. Bu flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme ve antioksidan özellikleri, yapılarında bulunan üç gruptan ileri gelir. Bu yapısal gruplar şunlardır.

- a) B halkasındaki o-dihidroksi (kateşol) grubu
- b) C halkasında ki karbonil grubunun 4-okzo grubu ile 2,3 çift bağın konjugasyonu
- c) A halkasındaki 3 ve 5 hidroksil grupları



Şekil 17: Quercetin bileşiğinin açık formülü ¹³

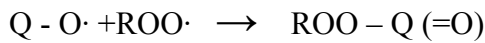
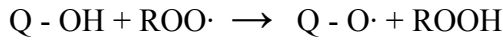
Quercetin yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir ve hücrede serbest radikalleri şu şekilde temizler.

a) $O_2^{\cdot -}$ radikalinin temizlenmesi

b) $\cdot OH$ radikalinin temizlenmesi: Bu etkilerini metal iyonlarının şelasyonu aracılığıyla gerçekleştirirler.

c) NO 'in $O_2^{\cdot -}$ radikali ile etkileşmesi sonucu ONOO \cdot meydana gelir. Q, $O_2^{\cdot -}$ radikalini temizleyerek peroksinitrit radikalinin üretimini baskılayabilir. NO moleküllerinin flavonoidler tarafından direkt olarak temizlendikleri de bildirilmiştir.

d) Lipit peroksil radikali (ROO \cdot) ile reaksiyona girerek zincir kırıcı bir etki ile lipit peroksidasyonunu inhibe ederler.



Quercetin (Q-OH), lipit peroksil radikali ile reaksiyona girerek onu indirgerken kendisi daha kararlı bir radikal yapı olan (Q-O \cdot) oluşturur ⁴¹.

e) Quercetin lipofilik bir antioksidandır ve lipit tabakalarının arasına yerleşerek lipit hasarını önleyici etkiye sahiptir ⁴¹.

Flavon bileşiklerin antioksidan potansiyellere sahip oldukları bilinir ve geniş bir kullanım alanları vardır. Quercetin bir flavon bileşiği olup doğada bitki çayları olarak bilinen bitkilerin yapraklarında, çiçeklerinde ve saplarında bulunur. Quercetin gibi diğer flavonoidlerin de serbest radikalleri temizleme özelliklerinin yanında antiviral, antitümoral, antialerjik, antitrombotik gibi etkileri içeren çeşitli biyolojik özellikleri vardır. Flavonoidler XO, fosfolipaz-A2, lipooksijenaz, siklooksijenaz, enzimlerinin

inhibisyonu, lökosit adhezyonunun ve aktivasyonunun azaltılması, mast hücresi degranülasyonunun inhibisyonu gibi etkileriyle antiinflamatuvar özellik gösterir.

Bazı flavonoidler süperoksit üretimini etkilemeden nötrofil degradasyonunu inhibe edebilir. Bazı flavonoidlerin inhibitör etkisi plazma membranındaki reseptör bağımlı Ca^{+2} kanallarını düzenlemesi ile olur. Q'in XO aktivitesini inhibe ettiği ve oksidatif hasarı azalttığı görülmüştür^{41,103}.

Flavonoid tüketiminin artması ile koroner kalp hastalığı görülmesi arasında ters bir ilişki vardır. Japonya'da yürütülen bir çalışmada quercetin alımının artmasıyla plazma total kolesterol ve LDL-kolesterol konsantrasyonlarının azaldığı görülmüştür. Finlandiya'daki bir başka çalışmada ise quercetin'den zengin elma ve soğan tüketimi arttığında koroner mortalite azalmış olarak bulunmuştur^{13,103}. Antioksidan özelliklerinden dolayı flavonoidlerin vasküler sistemde önemli etkileri mevcuttur. Oksijen radikalleri okside LDL oluşumuna neden olur ve bu endotelial duvarda hasara neden olarak aterosklerotik değişiklikleri başlatır. Flavonoid alımının koroner arter hastalığına karşı koruyucu (antiaterojen) etkisini içeren çalışmalar azdır¹⁰².

Quercetin'in bir diğer özelliğide siklooksijenaz ve lipooksijenaz denilen inflamatuvar mediatörlerini inhibe etmesidir. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz genel inflamatuvar cevabı başlatan araşidonik asidin salınımına neden olurlar. Lipooksijenazı içeren nötrofiller araşidonik asitten kemotaktik bileşiklerin oluşumuna neden olurlar, aynı zamanda sitokin salınımını sağlarlar. Quercetin hem siklooksijenazı hemde lipooksijenazı inhibe eder (antiinflamatuvar etki) Bu nedenle inflamatuvar metabolitlerin oluşumunu azaltır^{71,102}.

3.MATERYAL VE METOD

3.1 DENEY HAYVANLARI

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu onayı alınarak. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından, KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmalar standart deneysel hayvan çalışmalarına uygun olarak yapıldı. Bu çalışmanın finansman desteği KSÜ bireysel araştırma fonundan sağlandı. Deneylerde kullanılan toplam 40 adet erkek Sprague-dawley cinsi sıçan KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel hayvanları barınağından alındı. Sıçanlar 200±20 gram ağırlığında 4-5 aylıktır. Sıçanlar 21±1° C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyodunda tutularak standart rat yemi ve su verilerek beslendi.

3.2.DENEY GRUPLARI

Toplam 40 Sıçan, her grupta 8 hayvan olacak şekilde rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı.

Grup1 (Sham grubu-sağlam) : Ketamin anestezisini takiben ratlara hiçbir ilaç uygulanmadan laparotomiden 15 dk önce 0,3 ml salin içinde 50 mg/kg serum fizyolojik intraperitoneal olarak verilerek median laparotomi yapıp, renal arter izole edilerek böbrek dokusu alınan grup.

Grup2(Kontrol grubu-İ/R grubu): Ketamin anestezisini takiben laparotomiden 15 dk önce 0,3 ml salin içinde 50 mg/kg serum fizyolojik intraperitoneal olarak verilerek ratlarda renal arterde 60 dk iskemi ve 60 dk reperfüzyon sonrası median laparotomi yapılarak böbrek dokusu alınan grup.

Grup3 (Epigallokateşin-3-gallat grubu) : Ketamin anestezisini takiben iskemiden 15 dakika önce intraperitoneal 0,3 ml salin içinde 100mg/kg dozunda epigallokateşin-3-gallat uygulanıp median laparotomi yapılarak, 60 dakika iskemi, 60 dakika reperfüzyon yapıldıktan sonra renal arter izole edilerek böbrek dokusu alınan grup.

Grup4 (Quercetin grubu): Ketamin anestezisini takiben 0,3 ml salin içinde 30 mg/kg dozunda etken madde konularak iskemiden 15 dakika önce intraperitoneal olarak verilip. Sonra median laparotomi yapıp yine 60 dakika iskemi, 60 dakika reperfüzyon yapıldıktan sonra renal arter izole edilerek böbrek dokusu alınan grup.

Grup5 (Quercetin + Epigallokateşin-3-gallat grubu) : Ketamin anestezisini takiben 0,3 ml salin içinde 30 mg/kg dozunda Q ve 100mg/kg EGCG iskemiden 15

dakika önce intraperitoneal olarak verilip median laparotomi yapılarak 60 dakika iskemi, 60 dakikada reperfüzyon işleminden sonra renal arter izole edilerek böbrek dokusu alınan grup.

3.3.KULLANILAN İLAÇLAR

Çalışmada kullanılan ilaçlar şunlardır: Epigallaokateşin 3-gallat EGCG (Sigma Aldrich GmbH,E4268 Deltakimya/Adana) Quercetin (Deltakimya/Adana) Ketamin (Ketalar flakon, Deltakimya/Adana) Xanthine Oxidase (XO,1857 Sigma İnterlab/Adana) Glütasyon Redüktaz(Sigma, İnterlab/Adana) B-NADPH(Sigma, İnterlab/Adana),Xylazine Hydrochloride (Deltakimya/Adana) Na-K Tartarat tetrahydrat 25508 (Deltakimya/Adana)

3.4.RENAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI MODELİ

Çalışma KSÜ Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Sıçanlar laboratuara getirildiler ve tek tek tartılarak her birine intramüsküler olarak 60 mg/kg dozunda ketamin hidroklorid (Ketalar flakon, Eczacıbaşı Türkiye) verilerek anestezi sağlandı. Anesteziyi takiben hayvanlar sırt üstü yatırılarak yaklaşık 3 cm boyunda mediyan laparotomi yapılarak abdomen açıldı ve dikkatli bir şekilde böbreğe ulaşıldı. Sol renal arter izole edilerek küçük vasküler klemp yerleştirildi ve renal iskemi sağlandı. Bu sırada sıvı ve ısı kaybını önlemek amacıyla abdomen diğer bir klemp yardımıyla kapatıldı ve 1 saat boyunca renal iskemiye maruz bırakıldıktan sonra klemp açıldı ve bunu takiben bu kez 1 saat boyunca renal reperfüzyon sağlandı. Böylece 60 dk iskemi, 60 dk reperfüzyon süreci tamamlanmış oldu. Daha sonra klemp alınarak sol nefroktomi ile doku örneği alındı.

İlaç verdiğimiz gruplarda, etken maddeler intraperitoneal olarak iskemiden 15 dk önce İntraperitoneal (İP) verildi ve daha sonra 60 dk renal iskemi ve 60 dk reperfüzyona maruz bırakıldı. Sham grubunda ki sıçanlara ise mediyan laparotomi yapıp iskemi reperfüzyon yapılmadı ve etken madde verilmedi. Kontrol gurubunda ki sıçanlara da etken madde verilmedi bu gruba mediyan laparotomiye takiben 60dk iskemi, 60dk reperfüzyon yapıldı ve doku örneği alındı. Ancak sham ve kontrol grubuna laparotomiden 15 dk önce 0,3 ml salin içinde sadece 50 mg/kg serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi.

Deney sonunda, çıkarılan böbrek dokusu iki eşit parçaya ayrılarak histopatolojik incelemeler ve biyokimyasal incelemeler için uygun koşullarda saklandı. Histopatolojik

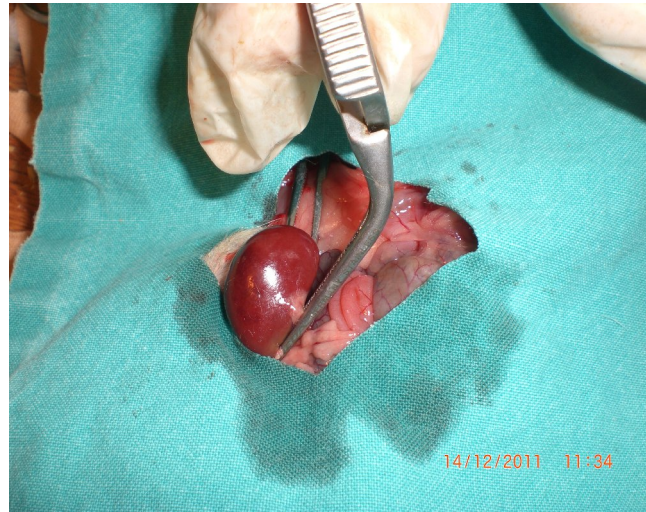
değerlendirme KSÜ Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında, biyokimyasal değerlendirmeler ise KSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı.



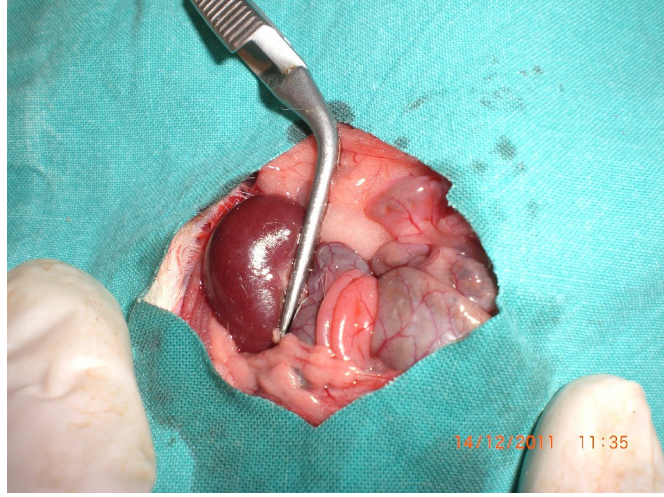
Şekil 18: Sol renal arter'in diseke edilişi



Şekil 19: Sol renal artere klemp uygulanması ve iskemi başlangıcı



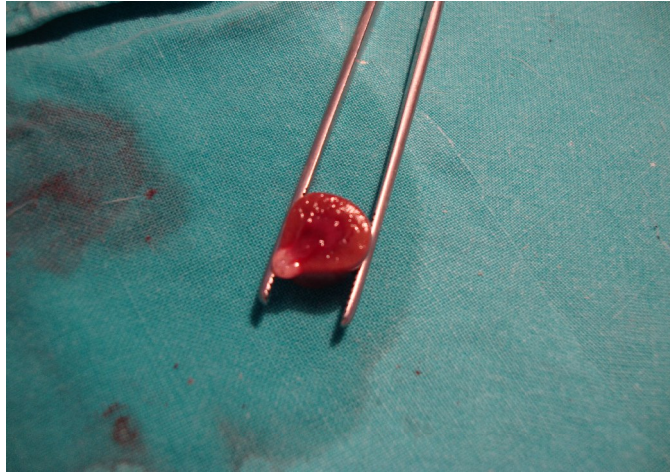
Şekil 20: İskemi sonrası 30.dk iskemik böbrek



Şekil 21: İskemi sonrası 60.dk iskemik böbrek



Şekil 22: Reperfüzyon sonrası sol böbrek materyali



Şekil 23: Reperfüzyon sonrası sol böbrek piyesi ikiye bölündüğündeki görünümü

3.5.BİYOPSİ ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE HAZIRLANMASI

Histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için alınan doku örnekleri, biyokimyasal incelemeler yapılana kadar serum fizyolojik içeren ependorflar içinde -20 °C'de çalışma zamanına kadar bekletildi ve işleme başlamadan hemen önce +4 °C de erimeye bırakıldı.

Daha sonra eriyen ve çalışmaya hazır olan doku örnekleri soğuklukları muhafaza edilerek teker teker tartıldı ve cam tüplere konuldu. Dokuların homojenize işlemine geçmeden önce dokulara 1 gr 3 hacim (hacim/ağırlık) %1,15 M KCl çözünme sağlamak amacıyla eklendi. Dokular 16.000 devir/dakika hızda 3 dk boyunca homojenize edildi. Enzim aktive kaybını önlemek amacıyla örnekler buz dolu küvete yerleştirildi. Daha sonra homojenatlar 14.000x rpm'de +4 °C 'de 45 dakika soğuk santrifüj edilerek süpernatantlar alındı ve ependorf tüplere ayrıldı bu ayrılan süpernatantlardan protein düzeyleri ve MDA ile SOD, CAT ve GSH-PX enzim aktive ölçümleri yapıldı.

3.6. PROTEİN DÜZEYİNİN TAYİNİ

Bu metot proteinlerin içerdiği trozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungstik – fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun spektrofotometrik yöntemle 750 nm'deki absorbans ölçümüne dayanır.

3.6.1 Ayıraçlar

1. A çözeltisi:

%2 Na₂CO₃ 2 g hazırlanır

0,1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. B Çözeltisi: B₁ ve B₂ çözeltilerinden oluşur.

a) B1 Çözeltisi:

% 1 CuSO₄.5H₂O 1g hazırlanır

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

b) B2 Çözeltisi:

%2 Na-K tartarat 2g hazırlanır

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

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 (v/v) oranında saf su ile sulandırılır ⁴¹.

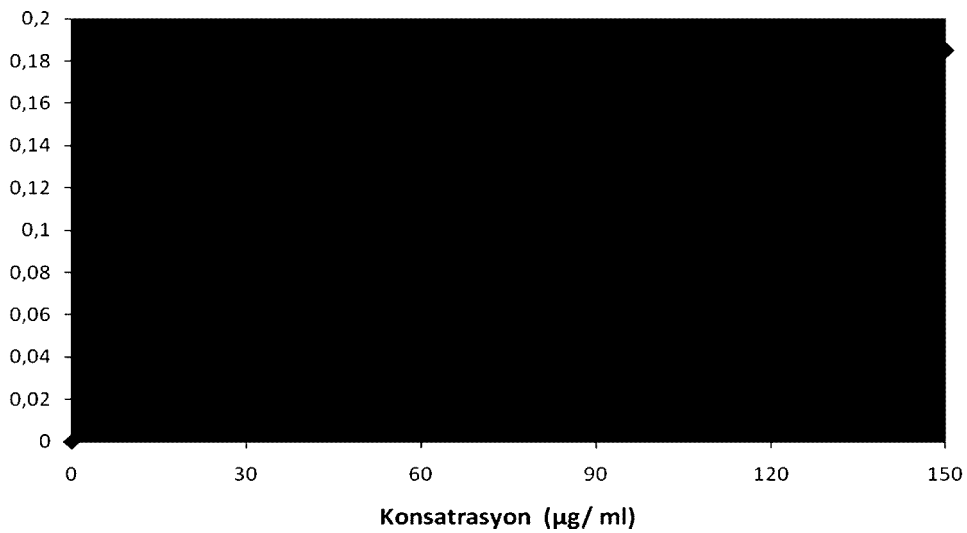
3.6.2. Standart Eğrinin Çizimi

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/ml konsantrasyon elde edilir. Bundan seri sulandırma ile 150, 120, 90, 60, 30 µg/ml' lik konsantrasyonlar elde edilerek 750 nm'de verdikleri absorpsiyonlar kaydedilir. Bu verilere göre konsantrasyon-absorpsiyon eğrisi çizilir ve her numune ölçümünde standart eğri tekrarlanır (şekil 19) ⁴¹.

Tablo 4. Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp no	Kör	1	2	3	4	5
Konsantrasyon (µg/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 24: Protein standart eğrisi

Doku Örnek Çalışması

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

Tablo 5: Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı

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

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

Hesaplanması

Doku örneğinin absorbansı standartın absorbansı ile karşılaştırılarak veya doğrudan standart eğrisinden değerlendirilir ve dilüsyon katsayısı ile çarpılarak sonuç verilir.

3.7.MELONDİALDEHİT (MDA) DÜZEYİNİN TAYİNİ

Aerobik şartlarda pH 3.40’de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90-95 C°’de inkübasyonu sonucu oluşan lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA’nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 532 nm’de spektrofotometrik olarak değerlendirilir^{41,108}.

3.7.1.Ayıraçlar

1. SDS %8,1’lik

Sodyum Dodesil Sülfat(SDS)

2. Asetik Asit %20’lik (pH 3,5)

3. Tiyobarbitürik Asit(TBA) %0.8 lik

4. N-Butanol/Piridin Çözeltisi (14/1)(v/v)

5. Stok Standart

1.1.3.3 tetramethoksiopropan (yoğunluk =0.99 g/ml)

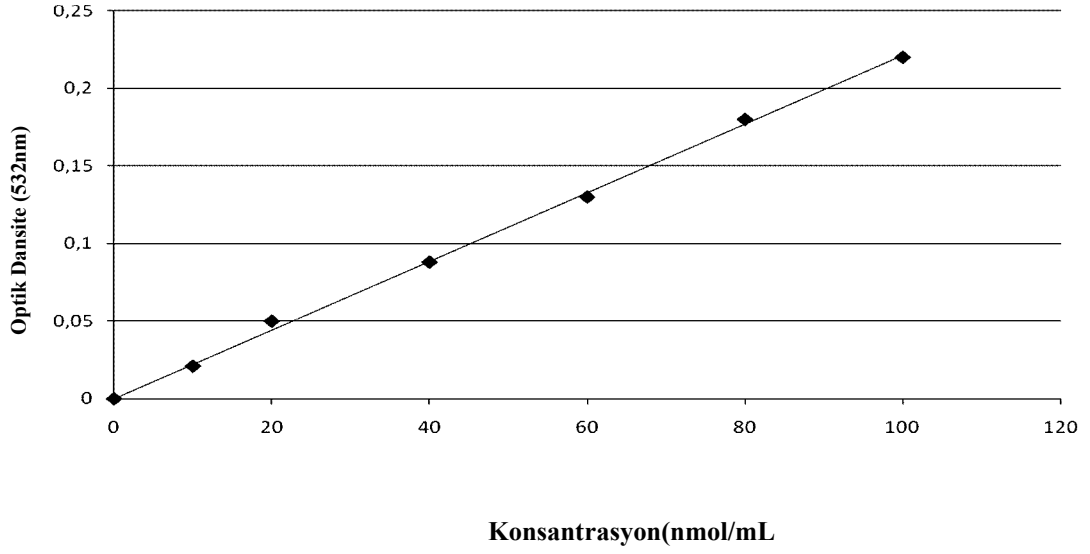
3.7.2.Standart Eğri Çizimi

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

Tablo 6: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp No.	0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon(nmol/ml)		100	80	60	40	20	10
Standart(ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SDS (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Asetik Asit (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TBA(ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf su (ml)	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Vorteksle karıştırılır.60 dk 90 C°de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.							
Saf su(ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
N-Butanol/Piridin	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Vorteksle karıştırılır.4000 rpm 'de 10 dakika santrifüj edilir.							

Tüpler N-Butanol /Piridin ilavesinden sonra iyice karıştırılır. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki organik kısım (üst faz) alınarak 532 nm'de absorbans fotometrik olarak okunur ve standart eğri grafiği çizilir (Şekil 16).



Şekil 25: MDA(Malondialdehit) standart eğrisi grafiği

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

Tablo 7: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı

	Örnek	Standart	Kör
Homojenat(Örnek)	0.1 ml	-	-
Standart	-	0.1 ml	-
%8.1 SDS	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
%20 Asetik Asit	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
%0.8 TBA (sulu)	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Saf su (ml)	0.7 ml	0.7 ml	0.8 ml
Vorteksle karıştırılır.60 dk 90 C°’de inkübe edildikten sonra musluk suyu altında soğutulur.			
Saf su (ml)	1 ml	1 ml	1 ml
N-Butanol/Piridin (v:v 15/1 oranında)	5 ml	5 ml	5 ml

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

3.7.3. Hesaplanması

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

MDA Düzeyi (nmol/mg protein)-MDA Değeri (nmol/ml)/Protein (mg/ml)

3.8. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTE TAYİNİ

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (piyodonitrotetra zolium viyolet: 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, buadaki farkın belirlenmesiyle de SOD aktivitesi ölçülür¹⁰⁶.

3.8.1. Ayıraçlar

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

50.00 mM CAPS	1.1065 gr
0.94 mM EDTA	0,035 gr
Doymuş NaOH	11.1 µl
Saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.	

2. Substrat Karışımı

0.05 mM Ksantin	0.00152 gr
INT	0.00253 gr

Bu karışım CAPS tamponuyla 100 ml'ye tamamlanır.

3. 80 Ü/L Ksantin oksidaz

50 Ü Ksantin oksidaz	3.04 µl
Saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.	

4. 0.01 MFosfat tamponu (pH:7 ayarlanır)

Na ₂ PO ₄	54.91 mg
NaH ₂ PO ₄	3.58 mg

Saf su ile 100 ml 'ye tamamlanır.

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

3.8.2. Standart Eğri Çizimi

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

Tablo 8: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

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

S1: Kör (fosfat tamponu)

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

Tablo 9: SOD standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı

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

Ksantin oksidaz eklendikten sonra tekrar karıştırılır 30 saniye sonra çalışma körünün ve standardın 37 °C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbansları (A₁) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbansları (A₂) tekrar okunur.

3.8.3. Hesaplama

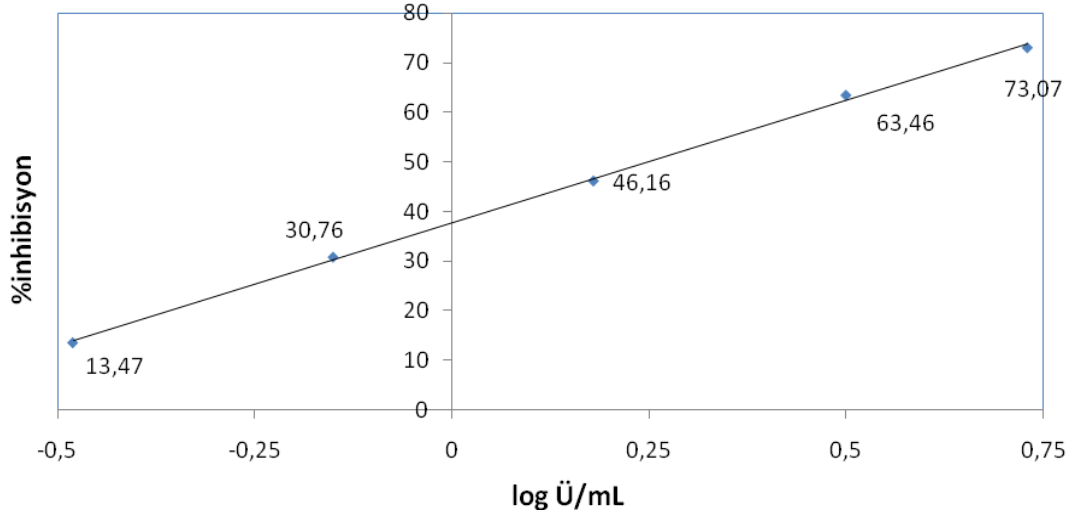
Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körüyle oranlanarak hesaplama yapılır.

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

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

ΔA çalışma körü

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



Şekil 26: SOD standart eğrisi

Örnek Çalışması

Tablo 10: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars tüplerin hazırlanışı

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

Tüpler tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37°C’de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbans(A₁) okunur. 3 dakika sonra absorbans (A₂) tekrar okunur.

Hesaplama:

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

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

Δ A çalışma körü

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

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

3.9. Glutasyon Peroksidaz(Gsh-Px) Aktivite Tayini

Glutasyon peroksidaz aktivitesi süpernatantta Beutler yöntemiyle saptanmıştır¹⁰⁷. Aşağıda verilen reaktifler tabloda (Tablo 11) gösterilen oranlarda tüplere konulur ve tüpler 37°C ‘de 10 dakika inkibasyona bırakılır¹⁰⁷.

Kullanılan Reaktifler

1. 1M Tris-HCl (8.8 gr), 5 mM EDTA Tamponu (0.1861gr) (pH:8)
2. 0.1 M GSH (glutasyon) 1,537 gr - 50 ml distile suda
3. 10 Ü/ml GR (glütasyon redüktaz) (günlük hazırlanır) 50µl -1ml distile suda

4. 2mM NADPH (nikodinamid adenin dinükleotit fosfat) 0.1666 gr 100 ml'ye tamamlanır.

5. 7mM t-butil hidroperoksit (günlük hazırlanır)

Tablo 11:Doku örneğinde GSH-Px tayini için deney tüplerinin hazırlanışı

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

İnkübasyon sonrası örnekler 1cm kuvars küvete konur üzerine 10 µl 7 mM t-bütildidroperoksit konulduktan sonra okuma başlatılır. Bu tepkime, 37 °C'de enzim tarafından oksitlenen 1 µmol NADPH' in 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde optik dansitedeki azalışı kinetik olarak 2,5 dakika süreyle okunur¹⁰⁷.

Hesaplama

$$\text{GSH-Px Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0 \text{ ml})}{6.22 \times V_H (0,01 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi (O.D farkı)

V_H : Örnek hacmi

V_T : Toplam hacmi

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

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

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

3.10. KATALAZ (CAT) AKTİVİTE TAYİNİ

Katalaz, H_2O_2 'nin yıkımını katalize eder. H_2O_2 'nin CAT tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir¹⁰⁷.

Ayıracılar

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

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

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. 1 M Fosfat tamponu, pH 7.0

K_2HPO_4	6.723 gr
KH_2PO_4	8.344 gr

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3. 10 mM H_2O_2

%30' luk peroksitten 10 μ l alınır ve 9.990 μ l saf suyla tamamlanır.

4. Etanol (%95'lik)

Yöntem

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

Tablo 12:Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
1M Tris-HCl, 5mM Na ₂ EDTA tamponu,pH 8.0	50	50
10 mM H ₂ O ₂	-	900
Saf su	930	30
37 °C’de 10 dakika inkübe edilir.		
Örnek (sulandırılmış)	20	20

Tüpler 37 °C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra daha önce 1:50 oranında dilüe ettiğimiz örnekten 20 µl alınarak tüplere ilave edilir ve 230 nm’de 2,5 dakika kinetik okuma yapılır. Her numune teker teker çalışılarak kaydedilir¹⁰⁷.

Hesaplama

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

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Örnek hacmi

V_T : Toplam hacim

0.071: 10mM H₂O₂ yıkım hızının verdiği OD değeridir.

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

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

3.11. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Alınan böbrek dokusunun histopatolojik incelenmesi için böbrek doku örnekleri % 10’ luk notral formaldehit solusyonunda fikse edildi. Rutin işlemlerin sonrasında 5µm kalınlığında hazırlanan doku kesitleri Haris hematoksilen-eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Değerlendirmede, histopatolojik inceleme için; “vasküler yapılarda dilatasyon – konjesyon”, “tübüler vakoulizasyon”, “mononükleer hücre artışı” ve “tübüler nekroz” olmak üzere 4 parametre esas alınarak incelendi.

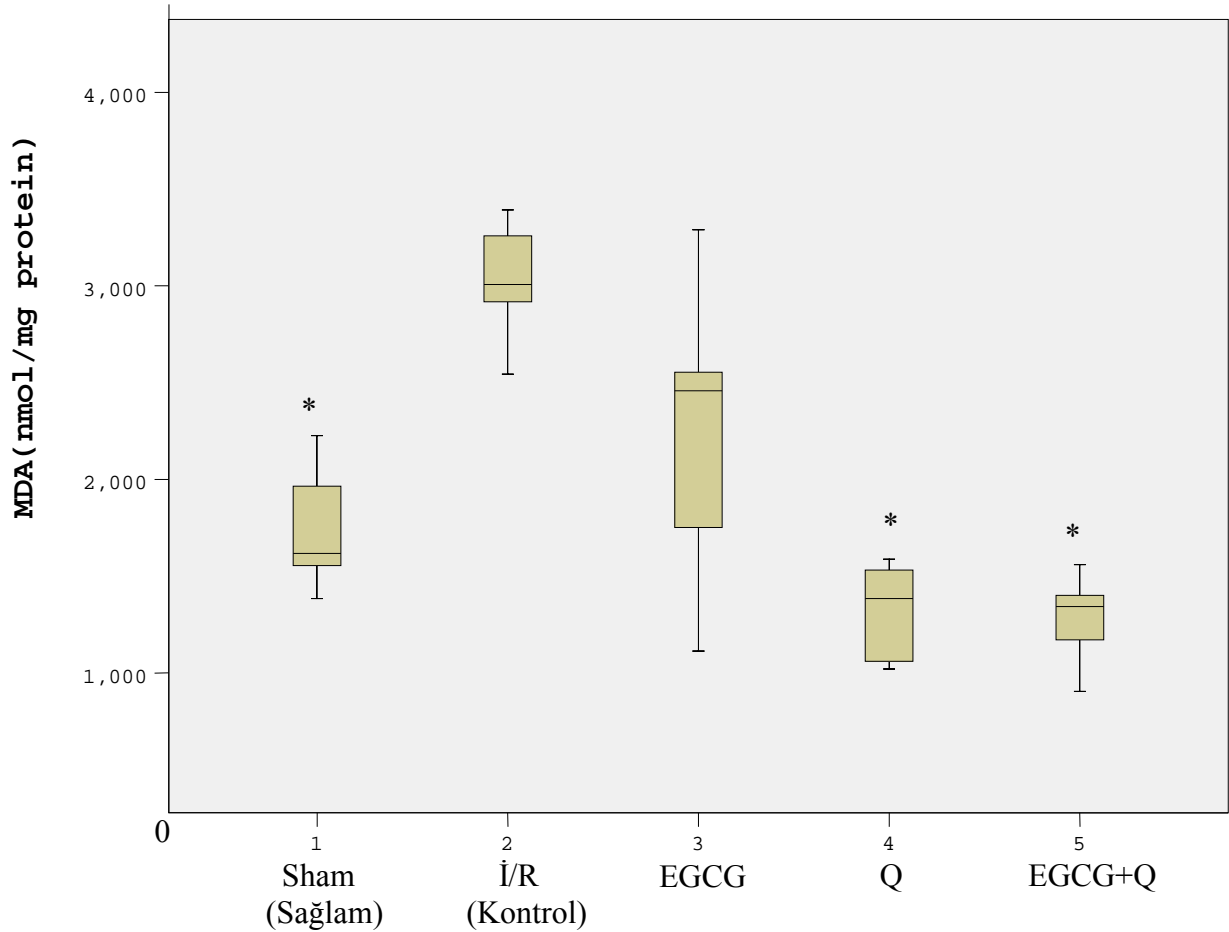
3.12. İSTATİSTİK

İstatiksel analizin yapılmasında bilgisayar programı olarak SPSS for Windows istatistik programının Release 9.05 sürümü (SPSS Inc.,Chicago,IL;USA) kullanıldı. Sonuçlarımız ortalama \pm standart sapma şeklinde verildi. Biyokimyasal verilerimizin değerlendirilmesinde ise gruplar arasındaki farkların incelenmesi için Non Parametrik Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın değerlendirilmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Her iki test içinde $p < 0.05$ değeri istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. MDA DEĞERLERİ ÜZERİNE ETKİLER

Böbrek dokusunda tespit edilen MDA değerleri incelendiğinde 0,91nmol/mgprotein ile 4,21 nmol/mg protein arasında değişen değerler elde edilmiştir. Kontrol grubunda ki MDA değerlerinin Sağlam gruba ve ilaç gruplarına göre yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$), ortalama MDA düzeyleri hesaplandığında en düşük değer EGCG+Q grubunda ($1,30\pm 0,25$ nmol/mg protein) olduğu en yüksek MDA değerinin ise İ/R grubunda ($3,5\pm 0,75$ nmol/mg protein) olduğu görülmektedir. Q grubu ile EGCG+Q grubu benzerdir fakat kontrol (İ/R) grubuna göre anlamlı olarak düşüktür ($p<0.05$).



Şekil 27: Graplarda MDA düzeyleri

*: Deney kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ($p<0.05$)

Gruplar arasındaki MDA düzeyleri kıyaslandığında

1-Deney kontrol grubundaki MDA seviyesi anlamlı olarak en yüksek değer tespit edildi($p<0.05$).

2-İlaç uygulanan tüm gruplarda tespit edilen MDA değerleri, Deney kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ve düşük tespit edilmiştir($p<0.05$).

3-İlaç uygulanan gruplarda MDA değerleri arasındaki farklara bakıldığında Q ve EGCG+Q grubundaki MDA değerleri benzer fakat EGCG grubuna göre daha düşük tespit edilmiştir($p<0.05$).

4-İlaç gruplarından EGCG+Q ve Q grupları MDA değerleri arasında ise belirgin bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 13: Deney gruplarında biyokimyasal parametreler

(Ort \pm Std. S.
Min.-med.-max)

	Protein (nmol/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)	SOD (U/mg Protein)	GSH-Px (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)
Sham (Sağlam)	15,57 \pm 2,53 11,30- 16,31- 18,11	1,81 \pm 0,5 # 1,38- 1,61- 2,67	12,0 \pm 2,90 # 6,91- 12,80- 15,45	0,06 \pm 0,013 0,045-0,054-0,080	65,40 \pm 11,35 # 49,52-66,74-79,16
İ/R (Kontrol)	14,79 \pm 2,62 11,22- 15,17- 19,27	3,13 \pm 0,49 * 2,54- 3,00-4,21	9,42 \pm 2,31 6,88-8,45-13,89	0,05 \pm 0,015 0,031-0,051-0,075	53,37 \pm 6,59 * 47,28- 51,48- 64,62
EGCG Grubu	15,23 \pm 6,03 8,94- 13,07- 24,41	2,21 \pm 0,74 # 1,11 -2,45- 3,28	18,50 \pm 5,86 * 7,68- 17,64- 25,21	0,09 \pm 0,036 * 0,03- 0,10- 0,12	56,64 \pm 15,16 * 41,22- 52,74- 83,86
Q Grubu	12,64 \pm 2,28 *# 8,13- 13,09- 15,66	1,31 \pm 0,25 # 1,02- 1,38- 1,58	16,62 \pm 2,78 * 12,5- 15,88- 21,00	0,081 \pm 0,051 * 0,031- 0,06- 0,19	59,0 \pm 9,14 *# 45,85- 59,07-73,51
EGCG+Q Grubu (Kombine ilaç)	13,84 \pm 2,61 11,37- 13,29- 19,93	1,27 \pm 0,21 # 0,90- 1,34- 1,56	19,95 \pm 5,25 # 12,12- 20,55- 28,83	0,13 \pm 0,043 *# 0,080- 0,130- 0,202	50,08 \pm 9,49 *# 37,79- 49,94- 61,55

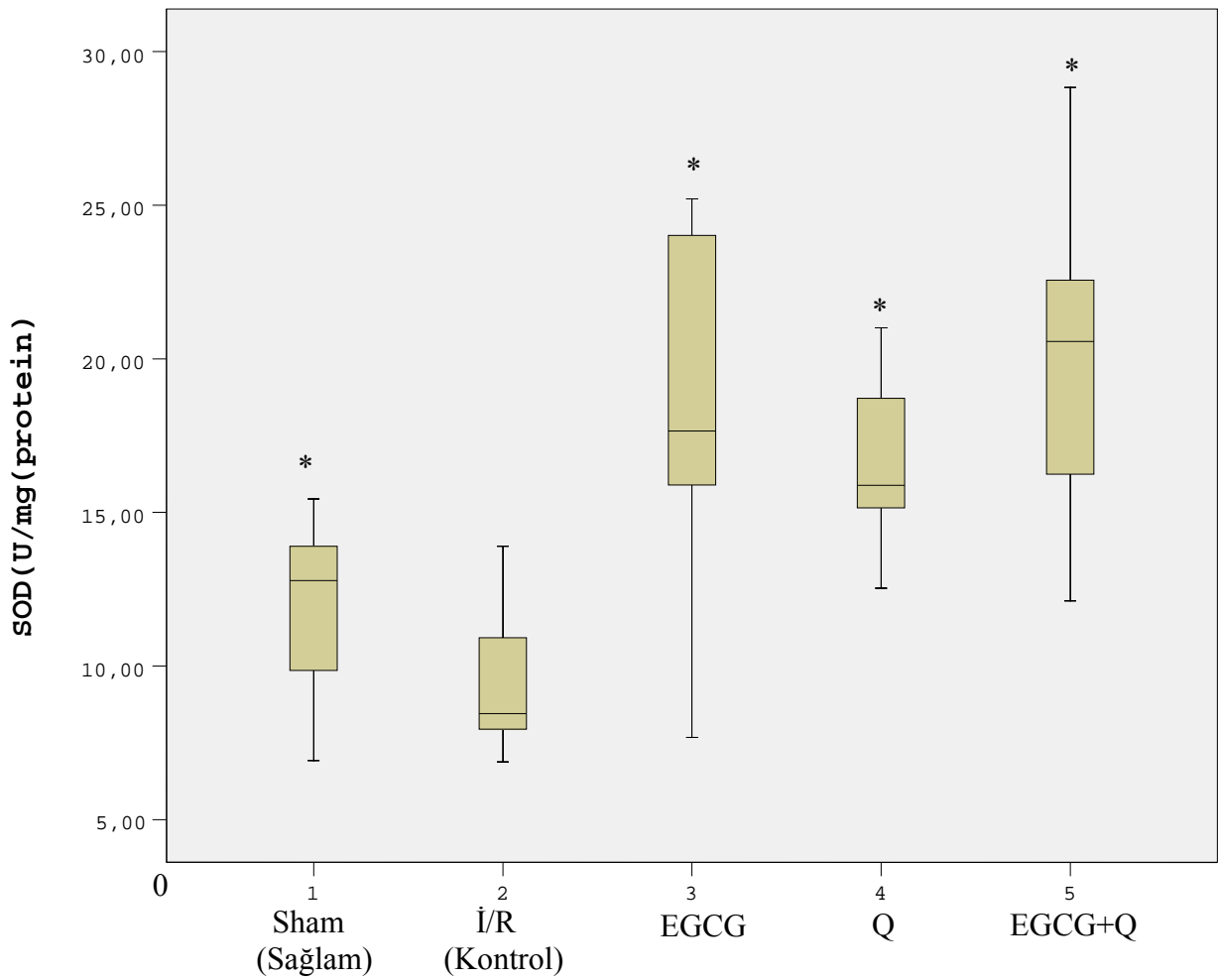
* : Sham grubuna göre istatistiksel anlamlı fark var ($p<0.05$)

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

Tabloda Deney gruplarındaki biyokimyasal veriler, ort \pm Std. Sapma (üstte) ve minimum-medium-maximum (altta) değerler olarak ifade edilmiştir.

4.2. SOD AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLER

Böbrek dokusunda tespit edilen SOD değerleri incelendiğinde 6,88 Ü/mg protein ile, 28,833 Ü/mg protein arasında değişen değerler elde edilmiştir. Ortalama SOD değerleri hesaplandığında en düşük SOD değerini kontrol(İ/R) grubunda (9,423 Ü/mg protein) olduğu, en yüksek SOD değerinin ise EGCG+Q ilaç grubunda (19,956 Ü/mg protein) olduğu saptanmıştır.



Şekil 28: Gruplarda SOD aktivitesi

*: Deney kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p < 0.05$)

Gruplar arasındaki SOD düzeylerini kıyaslandığında

1- Deney kontrol grubundaki SOD aktivitesi, Sağlam gruba göre anlamlı olarak daha düşüktür ($p < 0.05$).

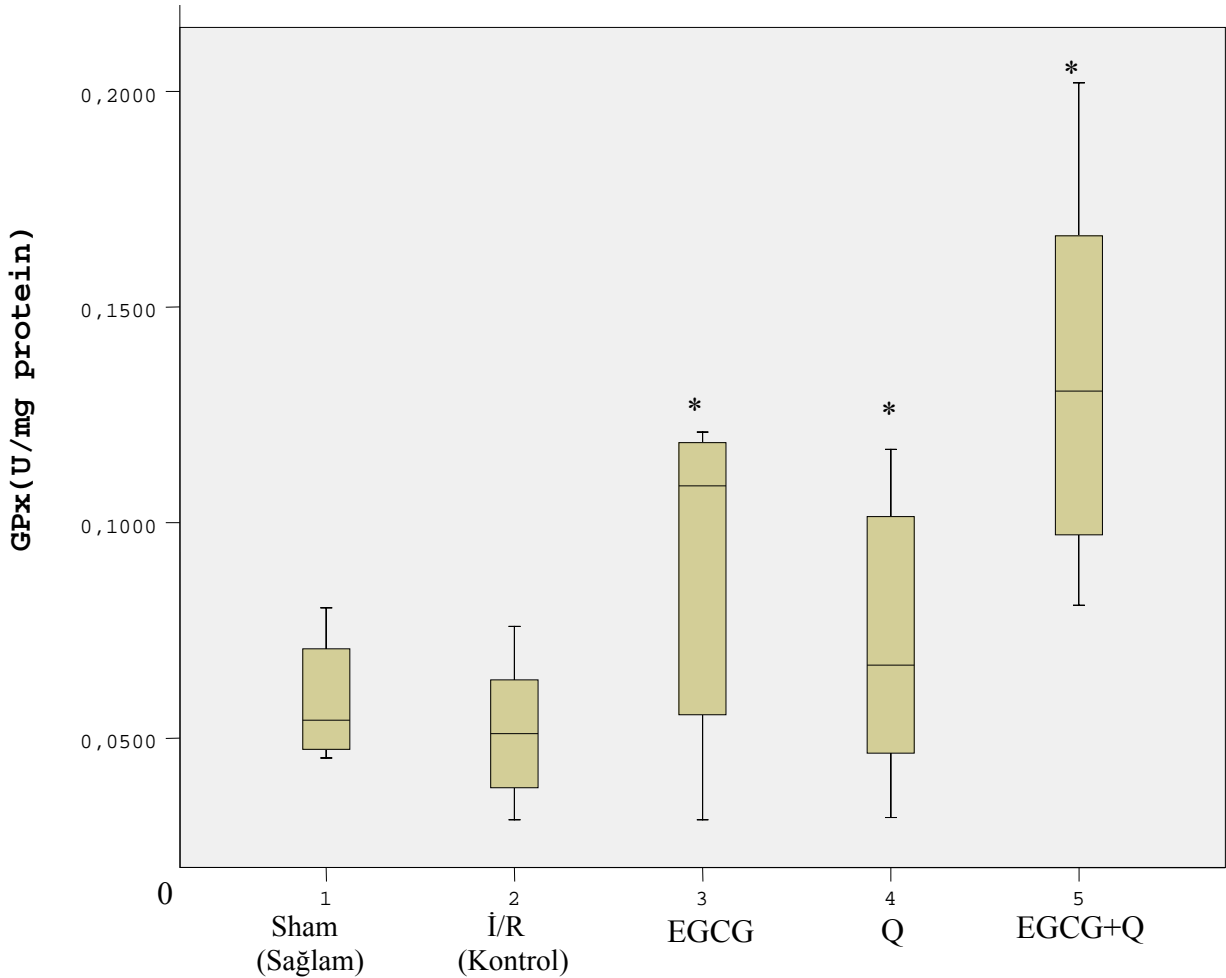
2- EGCG grubundaki SOD değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

3- Q grubundaki SOD değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

4- EGCG+Q gruptaki SOD değerleri de kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$), ancak kombine grupla diğer ilaç grupları arasındaki fark anlamlı değildir ($p>0,05$).

4.3. GSH AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLER

Böbrek dokusunda tespit edilen GSH-Px değerleri incelendiğinde 0,0311 Ü/mg protein ile 0,202 Ü/mg protein arasında değişen değerler bulunmuştur. Ortalama GSH-Px değerleri hesaplandığında en düşük değerin kontrol grubunda (0,0516 Ü/mg protein) olduğu en yüksek GSH-Px değerinin ise EGCG+Q grubunda olduğu (0,1339 Ü/mg protein) tespit edilmiştir.



Şekil 29: Gruplarda GSH-Px aktivitesi

*: Deney kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p<0.05$)

Gruplar arasındaki GSH-Px düzeylerini kıyasladığımızda

1- Deney kontrol grubundaki GSH-Px aktivitesi, Sağlam gruba göre daha düşüktür fakat bu fark anlamlı değildir ($p>0.05$).

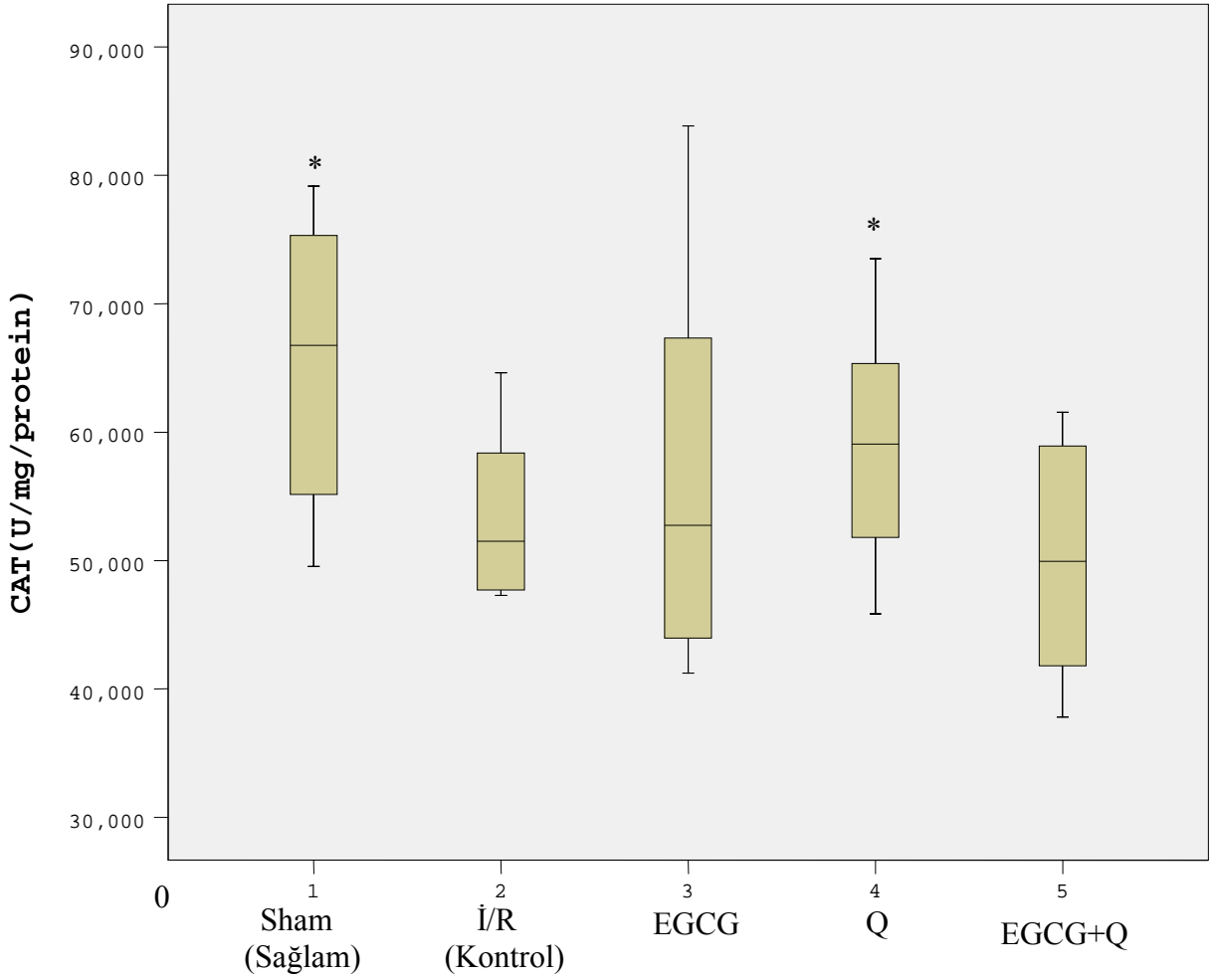
2- EGCG grubundaki GSH-Px değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

3- Q grubundaki GSH-Px değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

4- EGCG+Q gruptaki GSH-Px değerleri de kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.05$) ayrıca kombine grupta diğer ilaç grupları arasındaki farka bakıldığında EGCG+Q grubundaki GSH-Px değerleri diğer ilaç gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek tespit edildi ($p<0.05$).

4.4. KATALAZ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLER

Böbrek dokusunda tespit edilen CAT değerleri incelendiğinde 37,796 Ü/mg protein ile 83,865 Ü/mg protein arasında değişen değerler elde edilmiştir. Bunların ortalama CAT değerleri hesaplandığında en düşük değer EGCG+Q (50,085 Ü/mg protein) ve kontrol grubunda (53,379 Ü/mg protein) olduğu. En yüksek CAT değerinin ise sham grubunda (65,388 Ü/mg protein) olduğu saptanmıştır.



Şekil 30: Gruplarda CAT aktivitesi

*: Deneş kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p < 0.05$)

Gruplar arasındaki CAT düzeylerini kıyasladığımızda

1- Deneş kontrol grubundaki CAT aktivitesi, sham grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktür ($p < 0.05$).

2- EGCG grubundaki CAT değerleri kontrol grubuna göre yüksek tespit edilmiştir fakat bu fark anlamlı değildir ($p > 0.05$).

3- Q grubundaki CAT değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p < 0.05$).

4- EGCG+Q grubundaki CAT değerleri kontrol grubuna göre düşük tespit edilmiştir, fakat bu fark istatistik olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

4.5. HİSTOPATOLOJİK ANALİZ SONUÇLARI

Grupların histopatolojik analizlerinde, grupların kontrol grubuyla ve kendi aralarında karşılaştırılmaları yapılmış, vasküler yapılarda dilatasyon–konjesyon”, “tübüler vakoulizasyon”, “mononükleer hücre artışı” ve “tübüler nekroz” olmak üzere 4 parametre esas alınarak incelenmiş ve birbirleriyle aralarında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

5. TARTIŞMA

Böbrek iskemisi durumu, abdominal aorta yönelik cerrahilerde suprarenal klempaj sonrası, kısmi nefrektomi, böbrek transplantasyonu, sepsis (Bakteri veya diğer patojenlerin kan dolaşımına geçmesi), çeşitli ürolojik müdahaleler ve hidronefrozis gibi çeşitli klinik durumlarda görülür.

Böbrek nakilleri son dönem böbrek hastalıklarında tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Böbreğin donörden çıkartılıp, alıcıda arter bağlantısının sağlanmasına kadar geçen süre içinde böbreğe giden kan akımı kesilmiş olur ¹⁰⁹. Renal transplantasyon dışında da böbreklerde değişik nedenlerle meydana gelebilecek renal kan akımında azalma ile seyreden pek çok koşulda iskemik böbrek yetmezliği gelişmekte ve mortalitesi %50'lere kadar çıkabilmektedir ¹¹⁰. Klinik sonuçların yetersiz olması iskemi-reperfüzyon hasarı mekanizmalarının araştırılması ve önleyici stratejilerin geliştirilmesi için gerekçe teşkil etmekte ve bu konu birçok klinik ya da deneysel çalışmalara konu olmaktadır.

Bu çalışmada daha önceden de İ/R hasarına etkileri araştırma konusu olan antioksidanlar Epigallokateşin ve Quercetin'in diğer çalışmalardan farklı olarak birlikte (kombine) ve ayrı ayrı olarak, iskemi-reperfüzyon ilişkili etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada Wistar tipi erkek sıçanlar kullanıldı. Denek olarak sıçan kullanılmasının sebepleri öncelikle taksonomik olarak memeliler sınıfında yer alması, genetik ve moleküler yönlerden insana yakın birçok protein benzerliğinin bulunması, küçük bir yapıya sahip olup kolay müdahale edilebilmesi ve bütçe olarak masraflı olmayıp daha kolay bulunabilmesi olarak sıralanabilir.

İskemi ve reperfüzyon sırasında; mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca^{+2} artışı ve hücre iskeleti ile membran fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden enzim proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda SOR oluşarak, oksidatif strese neden olur. Paller ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada İ/R hasarının fizyopatolojisinde SOR'nin önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. Serbest radikallerin bu kadar artış göstermesinin asıl nedeni iskemik durum değil, azalmış oksijen seviyesinin reperfüzyonla birlikte ani artışıdır ^{16,46}.

İskemi sırasında küçük oranda SOR oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarda serbest radikal

oluşmakta ve bunlar da lipid peroksidasyonuna yol açarak hücrel hasarı artırmaktadır².

Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gerekli bir elementtir. O₂ hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin %1-3' ü tam olarak suya dönüşmez ve süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur⁵¹.

Hücre daima olumsuz şartlara karşı adaptasyon eğilimindedir ve bu süreç içinde ani bir oksijen artışı hücre içi bir çok sistemde oksidasyonu artıracığından oluşan ürünler substratlar arasındaki düzensiz korelasyon radikal üretimini tetikleyecek ve oluşan radikaller ise ilk hedef olarak lipidlere saldıracaktır böylece lipid peroksidasyonu artacak ve hasar mekanizması oluşacaktır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan önemli ürünlerden biri MDA'dır. MDA lipid peroksidasyonun bir ürünü ve göstergesidir^{37,54}.

Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda; Enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalarla SOR'ların etkilerini ortadan kaldıran maddelerin etkinlikleri deneysel ve klinik olarak gösterilmiştir. 1980'li yıllardan beri oksidatif doku hasarının göstergesi olarak, serum ve doku MDA değerlerine bakılmakta olduğunu belirten Singh ve Chopra ratlarda yaptıkları renal İ/R'de renal oksidatif doku hasarının göstergesi olarak doku MDA düzeylerine bakmışlardır. Bu çalışmada da doku hasarının göstergesi olarak renal doku MDA değerlerine bakılmış ve İ/R grubunda MDA değerlerinin diğer gruplara oranla belirgin olarak arttığı gösterilmiştir¹¹¹.

Mark ve ark.,ratlarda yaptıkları bir çalışmada renal iskemide MDA artışının, reperfüzyonla daha da arttığını göstermişlerdir. Onlara göre, reaktif oksijen radikalleri; iske miyle hücrel hasar oluştuğu zaman, hücre membranındaki poliansatüre lipitlerin peroksidasyonu sonucu membrandaki geçirgenliği bozar. Aynı şekilde hücre içindeki mitokondri ve lizozomal membranlarında oksidatif hasar oluşup mitokondrial membranda onarımı olmayan fosforilizasyon ve lizozomal membranda geçirgenlik artışına bağlı hidrolitik enzimlerle hücre yıkımı meydana getirir. Tübüler hücrelerde aynı olaylar olurken, tübüler transporte bozulur¹⁶.

Kahraman A. ve ark., böbrek iske mi-reperfüzyonunda quercetin ile tedavi yapılan grubun İ/R grubuna göre MDA'yı anlamlı derecede düşürdüğü, SOD ve CAT enzim aktivitelerini ise anlamlı yükselttiğini göstermişlerdir¹².

Sing D ve ark., renal İ/R üzerine yaptıkları çalışmada 2 mg/kg ve 30 mg/kg quercetin'i periton içine ayrı ayrı gruplarda vermişler ve MDA düzeyinin her iki

gruptada kontrol grubuna göre düştüğünü diğer enzim aktivitelerinin ise arttığını görmüşlerdir. 100 mg/kg oral olarak verilen Q grubunda ise tedavide etkili olmadığını belirtmişlerdir ¹¹¹. Bu çalışmalardan da yola çıkılarak bizim çalışmamızda da quercetin 30 mg/kg dozunda ayarlanarak intraperitoneal yoldan verilmiştir.

İnal M. ve ark., yaptıkları bir çalışmada sıçan böbreğine 30 dakika iskemi ve 45 dakika reperfüzyon yapmışlardır. İ/R grubunun böbrek dokusunda MDA düzeyi XO aktivitesinin arttığını tesbit etmişler, SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin ise azaldığını rapor etmişlerdir. Q verdikleri ilaç grubunda ise bu parametrelerin İ/R hasarı yapılan ilaçsız gruba göre MDA düzeyinin azaldığını SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerinin ise arttığını görmüşlerdir. Bundan yola çıkarak Q'nin böbrek İ/R hasarını iyileştirici etkisinin olduğu kanısına varmışlardır ¹¹³.

Kahraman A.ve ark., UV radyasyonla indüklenen oksidatif hasarda ve böbrek dokusu İ/R hasarında Q'nin O₂⁻ radikallerini yakalayarak SOD aktivitesindeki azalmayı önleyebileceğini belirtmişlerdir ^{12,102}. Bizde çalışmamızda Q verdiğimiz grubun SOD aktivitelerini yüksek bulduk.

Önceki çalışmalarda Q ve EGCG ile ilgili bazı çalışmalar bulunmaktadır fakat bizim çalışmamız dışında böbrek İ/R hasarına karşı bu ilaçların birlikte yani kombine bir şekilde uygulanışı bulunmamaktadır.

Alexandros E. Giakoustidis ve ark., yaptıkları çalışmada intestinal iskemi reperfüzyon hasarına karşı 30 adet sıçanda çalışmışlar ve intraperitoneal olarak verilen epigallocatechin-3-gallate'in karaciğer ve akciğer hasarını azaltıcı etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda karaciğer ve akciğer dokusunda İ/R grubunda MDA düzeylerinin, sham (sağlam) ve EGCG grubuna göre daha yüksek olduğunu saptamışlar ve EGCG'nin lipid peroksidasyonunu azaltıcı ve tedavi edici etkisi olabileceğini tespit etmişlerdir ¹¹⁵.

İskemi-reperfüzyon süresi saptanmasında süre olarak önceki çalışmalardan da yararlandık. Ozan ve ark., tek böbreğe uyguladıkları 60 dk iskemi, 60 dakika reperfüzyon modelinde böbrekte İ/R hasarının oluştuğunu biyokimyasal olarak göstermişlerdir.

Avlan ve ark. İse 45 dk iskemi, 60 dk reperfüzyon ve nefroktomi uygulayarak böbrek İ/R hasarını araştırmışlardır. Paller, 60 dk iskemi ve 15 dk reperfüzyon sonrası böbrekte İ/R hasarı oluşacağını ortaya koymuştur. Araştırmamızda literatürdeki çalışmaların deney modelleri de incelendiğinde çalışmada yaptığımız tek böbreğe

uygulanan 60 dk iskemi,60 dk reperfüzyon süresinin, böbrek İ/R hasarını oluşturması açısından yeterli bir süre olabildiği ve biyokimyasal olarak bu değişikliklerin gözlemlendiği tesbit edilmiş ancak histopatolojik değişikliklerin daha iyi gözlenebilmesi için daha fazla süreye ihtiyaç duyulacağı kanısına varılmıştır.

Çalışmamızda renal arter kapatılmıştır, lökositler iskemi reperfüzyon alanına saatler içinde dahil olmaktadır¹¹⁴. Bizim çalışmamızda reperfüzyon süresinin 60 dk olması nedeni ile lökosit aracılıklı reperfüzyon hasarı tam belirginleşmemiş olabilir. Histopatolojik değişikliklerin gruplar arasında anlamlı olmamasını da buna bağlayabiliriz. Ayrıca histopatolojik hasarlanmaya karşı bu ilaçların koruyucu etkisinin olup olmadığının anlaşılması için de lökosit düzeylerinin ölçüldüğü ve lökosit aracılı reperfüzyon hasarının oluşup oluşmadığının tespit edildiği ve ışık mikroskopuyla bu değişikliklerin izlendiği daha uzun süreli ve farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu araştırmada biyokimyasal hasarın oluşumunu göstermek ve kullanılan maddelerin hasara karşı koruyucu etkisini araştırmak için böbrek dokusunda MDA düzeyleri çalışılmıştır. Ortalama MDA değerleri hesaplandığında en düşük değer EGCG+Q grubunda ($1,30 \pm 0,25$ nmol/mg protein) en yüksek değer ise kontrol(İ/R) grubunda ($3,5 \pm 0,75$ nmol/mg protein) olduğu görülmüştür. Bu bulgu sonucunda verilen ilaç maddelerinin serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunu azalttığı söylenebilir. Aynı etki ilaç gruplarımızın her birinde ve kombine grubumuzda bulgularda belirtildiği gibi belirgin olarak görülmektedir. Kombine grubumuzda ki MDA seviyesi quercetin grubuna göre daha düşük olup epigallokateşin grubu seviyesine göre ise belirgin fark tesbit edilememiştir.

Hücre içinde oksijenin metabolize edildiği her yerde, antioksidanlar, oksijen ara metabolitlerini azaltmak için hızlı ve spesifik (enzimatik) olarak çalışırlar. Antioksidan savunmada öncelikle etkili olanlar enzimatik antioksidanlardır. Bunlar superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerdir^{3,4}. SOD süperoksit radikalini H_2O_2 ' ye katalizler. H_2O_2 ise CAT ve GSH-Px tarafından moleküler oksijen ve suya indirgenir. GSH-Px, glutatyon redüktaz aracılığı ile oluşan glutatyonu okside forma dönüştürür. Bundan dolayı bu enzimlerin konsantrasyonlarının ölçümü bize iskemi sonrasında oluşan serbest oksijen radikali hakkında bilgi verir^{41,59}. Bu araştırmada oluşan oksidan hasarın derecesini belirlemek ve verilen maddelerin hasarı önlemede ki başarısını görebilmek için MDA, SOD, GSH-Px ve CAT enzim aktiviteleri çalışıldı.

Bu çalışmada İ/R grubunda sağlam gruba göre oksidatif stres parametrelerinde artış olduğu, antioksidan ajanlarda ise anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Böbrek dokusundan çalıştığımız SOD enzim aktivitesi açısından en yüksek değerlerin ilaç verilen gruplarda anlamlı şekilde yüksek çıktığı görülmüştür ($p<0,05$). Ortalama SOD değerleri hesaplandığında en düşük değer kontrol (İ/R) grubunda (9,423 Ü/mg protein) olduğu en yüksek değer ise EGCG+Q grubunda (19,956 Ü/mg protein) olduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında, SOD aktivitesinin artışı, hasar sırasında oluşan serbest radikallere karşı bir savunma mekanizmasının oluşturulduğunu göstermektedir.

Hücre içinde oluşan serbest radikal hasarına karşı enzimatik ve non-enzimatik savunma mekanizmaları mevcuttur. A,C ve E vitaminleri, ürik asit, glutatyon nonenzimatik savunma mekanizmaları arasında önemli yer tutarken, SOD, GSH-Px ve CAT enzimleri de hücre içinde görev yapan enzimatik savunma sistemleri yani radikal süpürücü enzimlerdir. Bunlar 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 olarak zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır. Antioksidan ajanlar birlikte kullanıldığında da birbirlerinin etkilerini olumlu yönde artırarak daha güçlü bir koruma sağlayabilir, ortaya çıkabilecek yan etkilerde de azalma meydana getirebilirler^{41,112}.

Bu çalışmada kullanılan Epigallokateşin ve Quersetin önemli antioksidan maddelerdir. Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat ve epigallokateşin galat hem ilaç etken maddesi olarak ve hem de diyetle oldukça önemli yeri olan flavanollerdir⁵.

Yapısında EGCG bulunduran yeşil ve siyah çayın, içeriğinde bulundurduğu polifenolik bileşikler nedeniyle antioksidan bir içecek olduğu ve kronik hastalıklardan koruyucu etkisini bu yolla yaptığı belirtilmektedir^{8,9}.

Quercetin, meyve-sebze gibi besinlerde, kırmızı sarap, greyfurt, soğan, elma, siyah çay, az miktarlarda yapraklı yeşil sebzelerde ve fasulyede bulunan, antioksidan özellikleri olan bir bitki pigmentidir. Bu pigment, kötü kolesterolün okside olmasını önleyebilir ve hücrelerin kansere dönüşmesini geciktirebilir. Ayrıca quercetin adlı flavinoid madde çok güçlü bir antioksidan olup kolesterolü düşürmekte, kalp hastalıkları ve akciğer kanseri riskini azaltmaktadır. Quercetin'in bir antioksidan madde

olduğu ve akciğerleri ve solunum yollarını sigara ve kirli havanın etkilerinden korumaya yardımcı olduğu saptanmıştır^{95,100}.

Kakuta Y. Okumi M. ve ark., böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında Epigallokateřin-3-gallat'ın, HO-1 upregülasyonu ve makrofaj infiltrasyonuna karşı koruyucu etkisini incelemişler ve sıčanları sham, kontrol ve EGCG gruplarına ayırıp tüm sıčanlara tiyopental sodyum (30 mg / kg intraperitoneal) ile anestezi yapmışlar ve 50 mg / kg EGCG'ni, İ/R hasarından 48 saat, 24 saat ve 30 dakika önce sıčanlara vermişler ve 45 dk iskemi-reperfüzyona bırakmışlardır. Çalışma sonunda EGCG'nin lipid peroksidasyonunu azalttığı ve kontrol grubuna göre kreatinin seviyesinin düştüğünü, böbrek akut tübüler hasarını azalttığını, EGCG grubu MDA seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalış olduğunu belirtmiřlerdir¹¹⁶.

Quercetin, Fe ve Cu aracılığı ile hidroksil radikali oluşumunu önleyerek oksidatif hasara karşı koruma yapan çok güçlü bir antioksidandır. Serbest oksijen radikallerinden ·OH ve singlet oksijen gibi yapıları temizlediği, ksantin oksidaz ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Deneysel olarak İ/R hasarı oluşturulmuş modellerde de quercetin'in dokuyu İ/R hasarından koruduğu gösterilmiştir (Kahraman A.ve ark.)^{10,11,12}.

Bu araştırmada, quercetin antioksidanının İ/R hasarı üzerindeki etkilerini görebilmek maksadıyla bu antioksidan kullanıldı. 30mg/kg intraperitoneal olarak quercetin verilen gruptaki ratlarda (1,28±0,28 nmol/mgprotein) böbrek dokusu MDA değerleri kontrol grubuna göre (3,40± 0,82 nmol/mg protein) anlamlı düşük bulundu ($p<0,05$). Bu bulgu sonucunda Q'nin serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunu azalttığı söylenebilir. Yine 100 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak EGCG uygulanan, EGCG grubunda (2,10±0,90) ve EGCG+Q grubunda (1,180±0,30) MDA değerleri kontrol grubuna (3,40± 0,82 nmol/mg protein) göre anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Bu değerlere göre EGCG'nin ve kombine uygulanışının serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonunu azaltıcı etki yaptığı söylenebilir. EGCG ve Q kombine uygulanışı bu çalışma haricinde bulunmamaktadır. Kombine uygulanışta ki bu verimlilik İ/R hasarında kullanılabilirliği açısından faydalı olabilir.

SONUÇLAR

1- Deney Kontrol grubunda ki MDA seviyesi sağlam gruba(sham) oranla anlamlı şekilde yüksek tesbit edilmiştir ($p<0,05$). Bu durum uyguladığımız modelde böbrek İ/R hasarı oluştuğunu göstermektedir. İ/R hasarı sonrası oluşan oksidatif hasarı ortadan kaldırmaya çalışan ajan ve antioksidan enzimlerden SOD enzimi aktivitesi ise ilaç verdiğimiz gruplarda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

2- Böbrek İ/R sonrası oluşan hasara karşı kullanılan quercetin'in koruyucu antioksidan etkisi olabileceği gözlemlenmiştir. Q grubunda MDA düzeyi deney grubuna oranla düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Q verdiğimiz grupta SOD enzim aktivitesinde artış görölmüştür fakat bu artış, EGCG grubuna ve EGCG+Q grubuna göre daha azdır.

3- Böbrek İ/R hasarında EGCG verilen gruplarda MDA seviyesinin anlamlı azalışı, SOD ve GPx enzim düzeylerinin anlamlı artışı ($p<0,05$) bize bu antioksidanın koruyucu etkisi olabileceğini göstermiştir. Ancak CAT enzim aktivitesinde diğer gruplara oranla anlamlı bir artış gözlenmemiştir ($p>0,05$).

4- İ/R hasarına karşı uygulanan EGCG +Q (Kombine) grubunda, kontrol grubuna ve EGCG grubuna oranla MDA seviyesinin anlamlı azalışı görölmüştür ($p<0,05$). Fakat kombine grubta Q grubuna göre anlamlı bir fark tesbit edilmemiştir ($p>0,05$). SOD enzim aktivitesinde ise en yüksek değer kombine grubunda görölmüştür.

5- Bu sonuçlardan yola çıkılarak kullanılan EGCG ve Q antioksidanlarının ve bunların kombine uygulasınının böbrek İ/R hasarına karşı koruyucu etkisinin olabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Temel Patoloji. Çevikbaş U (Çeviren) 5. Baskı. İstanbul: **Nobel ve Yüce Kitabevi**, 1995:3-24.
2. Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. **J Invest Med** 1994; 42: 632-639.
3. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı Konya: **Mimoza Yayınları**. 1995:3-95.
4. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. **J Biochem** 1984; 222:1-15.
5. Ren, WY., Qiao, ZH., Wang, H.W., Zhu, L., and Zhang, L., “Flavonoids: promising anticancer agents”, **Medicinal Research Reviews**, 23:519–534(2003).
6. Katiyar, S.K., Mukhtar, H., “Tea antioxidants in cancer chemoprevention”, **Journal of Cellular Biochemistry**, 27: 59-67(1997).
7. Shahidi, F., Naczki, M., “Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications” , Lancaster: **Technomics**, 2-50, (1995).
8. Weisburger, J.H., Chung, F.L., “Mechanism by chronic disease caused by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols”, **Food and Chemical Toxicology**, 40:1145-1154(2002).
9. Cooper, R., Morr , D.J., Morr  , D.M., “Medical benefits of green tea: part II. review of anticancer benefits”, **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 11:639-652,(2005).
10. İ izler, M., Erkasap, N., Dernek, S., Kural, T., Kaygısız, Z., 2007, Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment, **Anadolu Kardiyol. Derg.** 7:404- 10.

11. Kahraman, A., Erkasap, N., Köken, T., Serteser, M., Aktepe, F., Erkasap S., 2003, The antioksidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions, **Toxicology**, 183:133-142.
12. Kahraman, A., Erkasap, N., Serteser, M., Köken, T., 2003, Protective effect of quercetin on renal ischemia-reperfusion injury in rats, **J. Nephrol**, 16:219- 224.
13. Ergüzel E. T: Quercetin (3,3',4',5,7- pentahidroksiflavon)'in Bakır (II) ve Çinko (II) Komplekslerin Kararlılık Sabitlerinin Tayini. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul 2006.
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. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in rat. **J Clin Invest** 1984; 74: 1156-1164.
17. Laurent B, Ardaillou R. Reactive oxygen species: production and role in the kidney. **Am J Physiol** 1986; 251: F765-F776.
18. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. **Am J Med** 2000; 109: 655-678.
19. Cotran R:Hücre Zedelenmesi Adaptasyon, Basic Pathology. Cotran R,Kumar V,Robbins S. **Nobel Tıp Kitabevleri**, İstanbul,1994;3-11.
20. Bulkley GB: Free radical-mediated reperfusion injury: A selective review. **Br J Cancer** 55 (Supl. 8): 66-73, 1987.

21. Rangan U, Bulkley GB: Prospects for treatment of free radicalmediated tissue injury. **British Med Bulletin** 49: 700-718, 1983.
22. Uysal M. “Serbest radikaller, lipit peroksidleri organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar”. **Klinik Gelişim**.1998; 11: 336–341.
23. Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemiareperfusion injury. **Am J Physiol** 255:H1269-H1275, 1988.
24. Schrier RW, Arnold PE, Putten VJV, Burke TJ: Cellular calcium in ischemic acute renal failure: Role of calcium entry blockers. **Kidney Int** 32:313-321, 1987.
25. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. **J SurgRes** 1996; 61: 469-472.
26. Yüzer H. Ketamin, tiyopental, propofol, etomidat ve intralipidin Böbrek iskemi reperfüzyon hasarına etkileri. Uzmanlık Tezi, K.Maraş Sütçü imam Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Bölümü,2008.
27. Horgan MJ, Ge M,Gu J et. al. Role of ICAM-1 in neutrophil mediated vascular injury after occlusion and reperfusion. **Am JPhysiol**.1991;259:L315-L319.
28. Lefter DJ, Scalia R,Campbell B et. al. Peroxynitrite İnhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. **J Clin İnvst**.1997; 4: 684-691.
29. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. **T4Thromb Haemost**. 2007; 97: 738-747.
30. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. **Br Med Bull** 2004; 70: 71-86.

31. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. **Cardiovasc Res** 2004; 61:481-497.
32. ŞENER G¹, YEĞEN B.Ç². 'İskemi Reperfüzyon Hasarı' Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakütesi Farmakoloji Anabilim Dalı¹, İstanbul Marmara Üniversitesi Tıp Fakütesi Fizyoloji Anabilim Dalı², **Klinik Gelişim**, İstanbul: 5-13.
33. Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. **Microvasc Res** 1991; 42: 125-138.
34. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo- Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. **J Invest Surg** 2009; 22: 46-55.
35. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. **Crit Care Med** 1993; 21: 1376-1386.
36. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. **Clin Cardiol.** 1993; 16(4 Suppl 1): I19-26.
37. Schiller HJ, Andreoni KA, Bulkley GB: Free radical ablation for the prevention of post-ischemic renal failure following renal transplantation. **Klin Wochenschr** 69: 1083-1094, 1991.
38. Cheeseman KH. Slater TF. An Introduction to radical biochemistry. **Br. Med. Bull** 1993; 49: 481–493.
39. Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J Allergy Clin Immunol** 2003;111(2 Suppl):S486-94. (İngilizce Vikipedi Mast hücresi makalesi kaynakçasından)
40. İnönü Üniversitesi **Tıp Fakültesi Dergisi**, 11 (2) 109-120 (2004), "Mast Hücreleri", Semra Erpek

41. Atlı Y. İntestinal iskemi Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Alfa Lipoik Asit Ve Quersetin'in Koruyucu etkilerinin Araştırılması Uzmanlık Tezi, K.Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı, 2009.
42. Moore KL: The abdomen: Clinically Oriented Anatomy. Üçüncü baskı. Satterfield TS(ed) **Williams&Wilkins Baltimore** 1992;127-242.
43. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Urinary System: **Basic Histology**. Yedinci baskı. Appleton & Lange, Lebanon 1992;371-393.
44. Şimşek E. Böbrek anatomisi. İçinde: Anatomi Fizyoloji: Hacettepe T.A.Ş Kitapçılık LTD. ŞKT. 1996;109-112.
45. Ozan E. Koyutürk L.Sapmaz T. Böbrek İskemi Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Prostoglandin E1(PGE)Kullnımının İncelenmesi: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilimdalı. **Fırat Tıp Dergisi** 2004;9(3):67-71
46. Aydoğdu N., Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında Nasetilsisteinin Etkileri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, **Fırat Tıp Dergisi** 2005;10(4):151-155.
47. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am J Med**.1991;91:14S-22S.
48. Koca N. Karadeniz F. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları Ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi **Gıda Mühendisliği Dergisi**. Sayı 16, 2003; 32-37.
49. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB: Pharmacological Approach to Tissue Injury Mediated by Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites. **Am J Surg** 161: 488-503, 1991.

50. Greene EL, Paller MS: Oxygen Free Radicals in Acute Renal Failure. **Miner Electrolyte Metab** 17: 124-132, 1991.
51. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. **Jpn J Physiol.** 1996; 46:15–32.
52. Wall J. Antioxidants In Prevention Of Reperfusion Damage Of Vascular Endothelium. **TSMJ May 2000**;1:67-70.
53. Ceylan T. Sıçanlarda Oluşturulan İnce Bağırsak İskemi-Reperfüzyon Hasarında Curcumin'in Etkinliği Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Edirne – 2006
54. Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikalleri ve hücre hasarı. **Sendrom.** 2000; 9: 31 36.
55. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Hastalıkların patogenezi ve tedavisinde reaktif oksijen partikülleri ve antioksidanlar. **Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Association** 1997; 3-4: 96-101.
56. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. **Crit Care Med** 1993;21(9):1376-86.
57. 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.
58. 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.
59. Yalçın SA. Antioksidanlar. **Klinik Gelişim** 1998;2:342-7.
60. Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol Rev** 2002;54(2):271-84.

61. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **Eur J Pharmacol** 2001;426(1-2):1-10.
62. Oral T. İnsan biyokimyası. Ankara: **Palme Yayıncılık**, 2002:665-74.
63. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med**.1967;70(1):158-69
64. Halliwell B. Antioxidants In human health and disease. **Annu Rev Nutr**. 1996;16:33-50.
65. Gruszecki WI, Strzalka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochim Biophys Acta**. 2005 May 30; 1740 2: 108-15. Epub 2004 Dec 16.
66. Droge K, Schulze-Osthoff S, Mihm D, Galter H, Schenk HP, Eck S, Roth, Gmunder H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. **FASEB J**. 1994; pp. 1131–1138.
67. Haddad JJ, Olver RE, Land SC. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 and NF-B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells, **J. Biol. Chem**. 2000; pp. 21130–21139.
68. Becker BF, Reinholz N, Leipert B, Raschke P, Permanetter B, Gerlach E. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. **Chest**. 1991; 100: 176-181
69. Leon J,Acuna-Castroviejo D,Sainz RM, et. al. Melatonin and mitochondrial function, **Life Sci**,2004;75(7):765-90.
70. Koçak A,Çolak A.Melatonin ve santral sinir sistemi. **Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi** 1996;3:237-44.
71. Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoidler. **Kocatepe Tıp Dergisi** (2002), 3, 01-08

72. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoid as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies *Methods in Enzymology*, 186:343-355. (1990)
73. Pütün EA. *Centaurea thracica* (Janka) Hayek ve *Centaurea Pichleri* Boiss. Subsp. *Pichleri* Flavonoidleri. Doktora tezi. T.C. Anadolu Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eskişehir. (1987)
74. Wright, L.P. 2005 Biochemical analysis for identification of quality in black tea (*Camellia sinensis*). Faculty of Natural and Agricultural Sciences Department of Biochemistry University of Pretoria. South Africa. Page 19 – 31.
75. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin, and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochem. Pharmacol.** 45(1):13 19. (1993)
76. Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochem. Pharmacol.** 37(5): 837-841. (1988)
77. Formica JV , Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Fd. Chem.Toxic.** 33 (12):1061-1080. (1995)
78. Higdon J, Ph.D. Victoria J. Drake, Ph.D. Linus Pauling Institute, Flavonoids. Oregon State University 2005.
79. Higdon, J.V. ve Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 43(1), 89-123.
80. Ratty AK. and Das NP. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: Structure-activity relationship. **Biochem Med Met Biol.** 39:69-79. (1988)

81. Suyanı E. Deneysel Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında Everolimus'un Oksidan-Antioksidan Sistem Ve Renal Histoloji Üzerine Etkileri. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara-2006.
82. McKay, D.L. ve Blumberg, J.B. (2002). The role of tea in human health. **Journal of American Collage of Nutrition**, 21, 1-13.
83. Yılmaz, Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. **Trends in Food Science and Technology**, 17, 64-71.
84. Porter, N.A. 1985. Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. In "Chemical Changes in Food During Processing", T. Richardson and J.W. Finley (Eds), pp:73-105. **Van Nostrand Rainhold Company**, New York.
85. Yang, C.S. and Landau, J.M., "Effects of tea consumption on nutrition and health", **American Society for Nutritional Sciences**, 130: 2409-2412(2000).
86. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. **Biochem Biophys Res Commun**. 2003; 305: 761-70.
87. Sarı S. Farelerde Ehrlich Asit Solid Tümör Modelinde Thymus Sipyaleus Ve Taurinin, Böbrek Mda, Glutasyon, Aopp Düzeylerine Ve Sod Aktivitesine Etkileri Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı Yüksek Lisans Tezi Ankara 2008.
88. Aydın M. Ratlarda Diyabetik Nöropatide Rol Oynayan Oksidatif Hasarın Önlenmesinde Likopenin Etkinliği Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi, Hatay 2008.
89. Xuczaj, W., Skrzydlewska, E., "Antioxidative properties of black tea", **Preventive Medicine**, 40: 910-918(2005).
90. Cabrera, C., Artacho, R., ve Gimenez, A. (2006). Beneficial effects of green tea-A Review. **Journal of American Collage of Nutrition**, 25(2), 79-99.

91. Yang, C.S., Maliakal, P. ve Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, 42, 25-54.
92. Na, HK., Surh, YJ., Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. **Mol. Nutr. Food Res. Feb**; 50(2): 152-9 (2006).
93. Okamoto, T., Safety of quercetin for clinical application. **International Journal of Molecular Medicine** 16: 275-8 (2005).
94. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cellular adaptations, cell injury, and cell death. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. Pathologic basis of disease. Philadelphia, Pennsylvania: **Elsevier Saunders**, 2005:3-46.
95. Morales, A.,I., Vicente-Sanchez, C., Jerkic, M., Santiago, J.,M., Sanchez- Gonzales, P.,D., Perez-Barriocanal, F., Lopez-Nova, J.,M., 2006, Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 210:128-135.
96. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. **Surg Clin North Am** 1992; 72: 65-83.
97. Özdamar M.Y. Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Grape Seed Proanthocyanidin (Üzüm Çekirdeği Proantosiyanidin) Ekstresinin Etkisi. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Konya-2008.
98. Fıçıcılar H. Yavuzer S. Ersöz G. Yorgancıoğlu R. Pasin M. Çelebi M. Travmatik Spinal Lezyonlu Olgularda İntrasellüler Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Ankara Üniversitesi **Tıp Fakültesi Mecmuası** Cilt 49, Sayı 4, 1996; 191-195.
99. Akhlaghi M, Bandy B: Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** 46 (2009) 309–317.

100. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia—reperfusion injury. **Br J Surg** 1996; 83: 162-170.
101. Yalçın A.S. Antioksidanlar. **Klinik Gelişim** 1998; 11: 342 –334.
102. Kahraman A.Ultraviyole A (UVA) Işığının Oluşturduğu Oksidatif stres üzerinde Quercetin'in rolü. Doktora Tezi.1998.
103. Karadag, R., “**Chemical Analysis**”, vol. 48 number 6 (2003) 931-937.
104. Sözmen E.Y. Yaşlanma Biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sözmen ET (editörler). İnsan Biyokimyası. 1.Baskı, Ankara: 2002; 667–672.
105. Birincioğlu M. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalı İskemi Reperfüzyon Tekniklerine Genel Giriş.
106. Fridovich I: Superoxide dismutase. **Adv Enzymol.**1974; 4: 35-97.
107. Beutler E: Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. 2nd edition, **Grune and Stratton Inc New York**; 1984.
108. Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K.Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** 1979; 95: 351-358.
109. Alejandro V, Scandling JD, Sibley RK, et al: Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. **J Clin invest** 95: 820-831,1995
110. Rabb H, Reynolds D, Ramirez G, et al: Renal ischemic-reperfusion injury in L-selectin deficient mice. **J Am Soc Neph** 6: 987a, 1995
111. Singh D, Chopra K. Effect of trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Pharmacological Research** 2004;50: 623–629.

112. Karaayvaz M, Öztürk HS, Elgün S, et. Al. İntestinal ischemia and free radical metabolism. **T Klin J Med Sci.** 1996; 16: 437-439.
113. İnal M, Altınışik M, Bilgin MD. The effect of quercetin on renal ischemia and reperfusion injury in the rat. **Cell Biochem Funct.** 2002 dec; 20(4):291-6.
114. Demir S. Erden M.İ. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. **Clin Chim Acta.** 1998; 275: 127-135.
115. Alexandros E. Giakoustıdı, Dimitrios E. Giakoustıdı. Attenuation of intestinal ischemia/reperfusion induced liver and lung injury by intraperitoneal administration of Epigallocatechin-3-gallate. **Free Radical Research,** January 2006; 40(1): 103–110.
116. Kakuta Y. Okumi M. Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration Department of Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, **Japan Transplant International** ISSN 0934-0874.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ahmet Çağrı KIR
Doğum Yeri : Pınarbaşı/ Kayseri
Doğum Yılı : 01.01.1985
Uyruğu : T.C.
Yabancı Dili : İngilizce
E-mail : faraklitmessage@gmail.com

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Lise : İbrahim Çalık Lisesi / K.Maraş-Merkez
Lisans : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü (2004-2008)
Tezsiz Yüksek Lisans : Çukurova Üniversitesi Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Alan
Öğretmenliği Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Öğretmenliği (Pedagojik formasyon
2008-2009) ADANA-Merkez
Yüksek Lisans : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi
Biyokimya Anabilim Dalı (2009-2012).

KULLANDIĞIM CİHAZLAR VE PROGRAMLAR

- ✓ Spektrofotometre UV
- ✓ Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)
- ✓ Elektroforez
- ✓ SPSS İstatistik Analiz Programı
- ✓ Microsoft Office Programları (Tümü– İyi derecede)

GÖREV ALDIĞIM PROJELER

Bireysel Araştırma Projesi (Bap) : Renal İskemi Reperfüzyon Hasarının
Önlenmesinde Epigallokateşin–3-Gallat Ve Quercetin Antioksidanları'nın Koruyucu
Etkilerinin Araştırılması

ALDIĞI EĞİTİM SERTİFİKALARI

- ✓ İngilizce Sertifikası (Advance düzey) (Milli Eğitim Bakanlığı)
- ✓ Bilgisayar İşletmenliği Sertifikası (Orta düzey) (Milli Eğitim Bakanlığı)