

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE
ALFA LİPOİK ASİT VE QUERSETİN' İN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

Dr. Yalçın ATLI
UZMANLIK TEZİ

KAHRAMANMARAŞ/2009

TEŞEKKÜR

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

Eğitimim sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkan'ı hocam Doç. Dr. Metin KILINÇ ve Öğretim Üye'si hocam Doç. Dr. Ergül BELGE KURUTAŐ ile çalışma arkadaşlarım Uz. Dr. İsmail TORU, Uz. Dr. Seçil ŐİMŐEK İMREK, Uz. Dr. Fidan BİLGE ve laboratuarda çalışan tüm personelimize,

Tez çalışmamda değerli katkıları olan Doç. Dr. Ertan BÜLBÜLOĞLU, Doç. Dr. Harun ÇIRALIK ve Doç. Dr. Ali ÇETİNKAYA hocalarıma,

Her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde ve karşılaőtığımız her türlü zorlukta beni destekleyen sevgili eşim Őeyma ATLI ve biricik oğlum Salih Erdem'e,

En içten teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Yalçın ATLI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
KISALTMALAR.....	VII
ÖZET, ANAHTAR KELİMELER	IX
ABSTRACT, KEYWORDS	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI	3
2. 1. 1. İskemi.....	3
2. 1. 2. Reperfüzyon	5
2. 1. 3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nötrofillerin Rolü.....	7
2. 1. 4. Komplemanın Rolü	9
2. 1. 5. Mast Hücresinin Rolü	10
2. 2. İNCE BAĞIRSAK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI.....	10
2. 3. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞUMU	12
2. 3. 1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri.....	14
2. 3. 1. 1. Süperoksit Radikalleri (O_2^{\bullet})	15
2. 3. 1. 2. Hidroksil Radikali (OH^{\bullet})	16
2. 3. 1. 3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	17
2. 3. 1. 4. Singlet O_2 (1O_2).....	18
2. 3. 1. 5. Hidroperoksil Radikali (HO_2^{\bullet}).....	18
2. 3. 1. 6. Hipokloröz Asit (HOCl).....	18
2. 3. 1. 7. Nitrik Oksit (NO).....	19
2. 3. 2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	19
2. 3. 2. 1. Endojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları	20
2. 3. 2. 1. 1. Mitokondrial Elektron Transport Sistemi.....	20
2. 3. 2. 1. 2. Araşidonik Asit Kaskatı	20
2. 3. 2. 1. 3. Ksantin Oksidaz (XO).....	20

2. 3. 2. 1. 4. Endoplazmik Retikulum.....	22
2. 3. 2. 1. 5. Peroksizom	22
2. 3. 2. 1. 6. Plazma Membranı	22
2. 3. 2. 1. 7. Otooksidasyon.....	22
2. 3. 2. 1. 8. Redoks Döngüsü	22
2. 3. 2. 1. 9. Fagositoz.....	23
2. 3. 2. 2. Eksojen Serbest Radikal Oluşum Mekanizması	24
2. 3. 3. Serbest Radikallerin Etkileri.....	24
2. 3. 3. 1. Hücre İçi Etkileri.....	24
2. 3. 3. 1. 1. Lipit Peroksidasyonu	24
2. 3. 3. 1. 2. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	26
2. 3. 3. 1. 3. Proteinlere Etkileri	26
2. 3. 3. 1. 4. Karbonhidratlara Etkileri.....	26
2. 3. 3. 2. Hücre Dışı Etkiler	27
2. 3. 3. 2. 1. Kemotaksi.....	27
2. 3. 3. 2. 2. Rolling	27
2. 3. 3. 2. 3. Adhezyon.....	27
2. 3. 3. 2. 4. Antiadhezyon Molekülleri İnhibisyonu.....	28
2. 4. ANTİOKSİDANLAR.....	28
2. 4. 1. Enzimatik Antioksidanlar.....	29
2. 4. 1. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	29
2. 4. 1. 2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	31
2. 4. 1. 3. Glutasyon Redüktaz	31
2. 4. 1. 4. Glutasyon-S-Transferaz (GST).....	31
2. 4. 1. 5. Katalaz (CAT).....	32
2. 4. 2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri.....	32
2. 4. 2. 1. E ve C vitamini	32
2. 4. 2. 2. Karotenoidler	33
2. 4. 2. 3. Glutasyon (GSH).....	33
2. 4. 2. 4. Ürik asit (Ürat).....	33
2. 4. 2. 5. Melatonin.....	34
2. 5. ALFA LİPOİK ASİT (α -LA)	34
2. 6. FLAVONOİDLER	37
2. 6. 1. Flavonoller.....	39

2. 6. 1. 1. Quersetin.....	39
2. 6. 1. 1. 1. Genel Özellikleri.....	39
2. 6. 1. 1. 2. Antioksidan Özellikleri	40
2. 6. 1. 1. 3. Quersetin Diğer Özellikleri.....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Kimyasal Maddeler.....	43
3.1.1. Diğer Aletler ve Cam Malzemeler.....	43
3. 2. Deney Hayvanları ve Modelin Oluşturulması.....	43
3. 2. 1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması.....	44
3. 3. YÖNTEMLER	45
3. 3. 1. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini.....	45
3. 3. 2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	46
3. 3. 3. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Tayini	50
3. 3. 4. Protein Düzeyinin Tayini	52
3. 3. 5. Ksantin Oksidaz (XO) Enziminin Aktivite Tayini	55
3. 3. 6. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini	56
3. 4. Histopatolojik Değerlendirme	57
3. 5. İstatistik.....	57
4. BULGULAR	58
4. 1. Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	58
4. 2. Histopatolojik Analiz Sonuçları	62
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇLAR	72
7. KAYNAKLAR.....	73

TABLO LİSTESİ

Tablo I: Oksijen türevi bileşikler	15
Tablo II: Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler.....	23
Tablo III: Antioksidanların sınıflandırılması.....	29
Tablo IV: Antioksidan savunma mekanizması	30
Tablo V: Flavonoidlerin alt sınıfları ve besinsel kaynakları.....	38
Tablo VI: Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerin hazırlanışı	46
Tablo VII: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	48
Tablo VIII: Standart eğri çizimi için kuvars küvetlerin hazırlanışı	48
Tablo IX: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerin hazırlanışı	49
Tablo X: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı	51
Tablo XI: Dokuda MDA düzeyinin tayini için tüplerin hazırlanışı	52
Tablo XII: Protein standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı.....	53
Tablo XIII: Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı.....	54
Tablo XIV: Doku örneğinde XO tayini için tüplerin hazırlanışı	55
Tablo XV: Doku örneğinde GSH-Px tayini için tüplerin hazırlanışı	56
Tablo XVI: Deney gruplarında biyokimyasal parametreler (ort \pm SS).....	59
Tablo XVII: Grupların histopatolojik analiz sonuçları	62

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Hücre membranı normal iyon dengesi	4
Şekil 2: İ/R'da endotel hasarı ve lipid peroksidasyonunu.....	7
Şekil 3: İ/R'den sonra lökositlerin endotel hücrelere yapışması	9
Şekil 4: Oksijen atomlarının yapısı.....	14
Şekil 5: Oksijen moleküllerinin yapısı.....	14
Şekil 6: XD-XO'a dönüşümü ve serbest oksijen radikallerinin oluşumu	21
Şekil 7: Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehitler.....	26
Şekil 8: Dihidrolipoik ve lipoik asidin kimyasal yapısı.....	34
Şekil 9: Lipoik asidin diğer antioksidanlarla etkileşimi.....	36
Şekil 10: Benzen halka yapısının birleşimi	37
Şekil 11: Flavonoidlerin kimyasal yapısı	37
Şekil 12: Heterosiklik C halka yapısı.....	38
Şekil 13: Quersetin'in yapısı ve antioksidan özellik gösteren grupları	40
Şekil 14: Süperoksit dismutaz standart eğrisi.....	49
Şekil 15: Malondialdehit standart eğrisi.....	51
Şekil 16: Protein standart eğrisi	54
Şekil 17: Grupların MDA düzeyleri.....	60
Şekil 18: Grupların CAT enzim aktivitesi.....	60
Şekil 19: Grupların SOD enzim aktivitesi.....	61
Şekil 20: Grupların GSH-Px enzim aktivitesi	61
Şekil 21: Grupların XO düzeyleri	62
Şekil 22: Grade 0: Normal ince barsak dokusu	63
Şekil 23: Grade 1: Mukozal hücrelerin dökülmesi kript yapıları korunmuş	63
Şekil 24: Grade 2: Mukozal villus nekrozu kript yapıları korunmuş.....	63
Şekil 25: Grade 3: Kript yapılarının da bozulduğu mukozal villus nekrozu.....	63

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
İ/R	: İskemi Reperfüzyon
PLC	: Fosfolipaz C
PIP2	: Fosfotidil İnozitol Bifosfat
IP3	: İnositol Trifosfat
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
O₂^{•-}	: Süperoksit Anyon Radikali
HOCl	: Hipoklorik Asit
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
IL-6	: İnterlökin 6
IL-1β	: İnterlökin 1 Beta
IL-12	: İnterlökin 12
CXC	: Sistein-X Amino Asit-Sistein
JNK-1	: c-jun N-Terminal Kinaz-1
PNL	: Polimorfonükleer Lökositler
XO	: Ksantin Oksidaz
C5a	: Kompleman 5a
LB4	: Lökotrien B4
NO	: Nitrik Oksit
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
İNF-γ	: Gamma İnterferon
ICAM-1	: İntersellüler Adhezyon Molekülü
ELAM-1	: Endoteliyal Lökosit Adhezyon Molekülü-1
MCP-1	: Lökosit-Monosit-Kemoatraktan Protein- 1
NFκB	: Nükleer Transkripsiyon Faktörü B
VCAM-1	: Vasküler Sellüler Adhezyon Molekülü
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
SMA	: Süperior Mezenterik Arter
O₂	: Oksijen
DNA	: Deoksiribonükleik Asit

FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit
HO₂[•]	: Perhidroksi Radikali
OH[•]	: Hidroksil Radikali
¹O₂	: Singlet Oksijen
NO[•]	: Nitrik Oksit Radikali
H[•]	: Hidrojen Radikali
RNA	: Ribonükleik Asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
ROO	: Peroksil Radikalleri
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
FMN	: Flavin Mononükleotit
ETS	: Elektron Transport Sistemi
PGG	: Prostoglandin G
PGH	: Prostoglandin H
XDH	: Ksantin Dehidrogenaz
-SH	: Tiyol
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
L[•]	: Yağ Asidi Zincir Radikali
L-O₂[•]	: Lipit Peroksil Radikali
MDA	: Malondialdehit
TBARS	: Tiyobarbitürik Asit ile Reaksiyona Giren Maddeler
GSSG	: Okside Glutasyon
GSH	: Redükte Glutasyon
GR	: Glutasyon Redüktaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
α-LA	: Alfa lipoik Asit
DHLA	: Dihidrolipoik Asit
ONOO[•]	: Peroksinitrit Radikali
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
OD	: Optik Dansite
Q	: Quersetin
MOF	: Multipl Organ Yetmezliği

ÖZET

İntestinal iskemi birçok cerrahi olgu esnasında oluşan ve patofizyolojisi hala tam olarak anlaşılamayan bir problemdir. Çalışmamızda sıçanlarda ince bağırsak iskemi reperfüzyon modelinde Quersetin (Q), alfa lipoik asit (α -LA) ve kombine (Q + α -LA) verilmesinin oksidatif hasarlanma üzerine etkinliği araştırıldı.

Çalışmada 40 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Her biri 8 adet sıçan içeren 5 grup oluşturuldu. Sıçanlar sham grubu, İ/R (iskemi reperfüzyon) kontrol grubu, İ/R'dan 1 saat önce Q verilen grup, İ/R'dan 15 dakika önce α -LA verilen grup ve bu ilaçların kombine (Q+ α -LA) uygulandığı grup olarak ayrıldı. Sham grubundaki sıçanlara, superior mezenterik arterin transeksiyonunu takiben herhangi bir işlem uygulanmadı. Kontrol grubundaki ve ilaç grubundaki sıçanlara 60 dakika iskemi, 60 dakika reperfüzyon uygulandı. İlaçlar intraperitoneal olarak Q 30 mg/kg, α -LA 100 mg/kg İ/R işlemi öncesi verildi.

Deney sonunda histopatolojik ve biyokimyasal çalışmalar için doku örnekleri alındı. Oksidatif hasarlanmanın tespiti için malondialdehit (MDA) düzeyi, ksantin oksidaz (XO) süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi çalışıldı. Histopatolojik hasarın tespitinde 6 aşamalı bir skorlama sistemi kullanıldı.

Kontrol grubu ile sham grubu karşılaştırıldığında MDA düzeyi, XO aktivitesi anlamlı yüksek iken ($p<0.05$), SOD ve CAT aktiviteleri anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$). Sham grubu ile ilaç verilen gruplar kıyaslandığında; α -LA grubunda CAT aktivitesi shama göre anlamlı düşük, XO aktivitesi anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). Kombine grupta ise XO aktivitesi anlamlı yüksekti ($p<0.05$). Diğer enzim aktiviteleri yönünden ilaç gruplarında shama göre anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Kontrol grubuyla ilaç grupları karşılaştırıldığında; kontrole göre MDA yönünden bütün gruplarda anlamlı düşüş oldu ($p<0.05$), SOD aktivitesi ise arttı ($p<0.05$). Q grubunda, kontrol grubuna göre XO aktivitesi anlamlı azaldı, CAT aktivitesi ise anlamlı arttı ($p<0.05$). Histopatolojik olarak sham grubunda hiçbir değişiklik oluşmadı. En fazla hasar İ/R yapılan kontrol grubunda meydana geldi, fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunamadı ($p>0.05$).

Sonuç olarak; intraperitoneal Q, α -LA ve kombine uygulamalarının, İ/R hasarını önlemede Q'nin daha etkili olmak üzere yararlı olabileceği fakat kombine uygulamalarının tedavide herhangi bir üstünlük sağlamadığını düşündürdü. Histopatolojik değişikliklere etkili olup olmadığı konusunda ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İskemi reperfüzyon, malondialdehit, ksantin oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz.

ABSTRACT

Intestinal ischemia is a problem which develops during the many surgery cases and whose pathophysiology is still not understood completely. In our study, the effectiveness of giving Quercetin (Q), alpha lipoic acid (α -LA) and its combination (Q + α -LA) on oxidative damage in intestinal ischemia reperfusion model in rats was investigated.

In this study, 40 Sprague – Dawley rats were used. Five groups each of which consists of 8 rats were formed. Rats were separated as; sham group, I/R (ischemia reperfusion) control group, group which was given Q one hour before I/R, group which was given α -LA fifteen minutes before I/R and the group which these medications were given in combination (Q+ α -LA). No other action was taken to sham group rats following superior mesenteric artery transection. 60 minutes ischemia and 60 minutes reperfusion were performed to the rats which are in control group and medication group. Medications were given before the I/R process as intraperitoneal Q 30 mg/kg, α -LA 100 mg/kg.

At the end of the experiment, tissue samples for histopathological and biochemical studies were taken. In order to identify the oxidative damage, malondialdehyde (MDA) level, xanthine oxidase (XO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) enzyme activities were studied. In the identification of histopathological damage a score system with 6 stages was used.

When control group and sham group were compared; MDA level, XO activity were significantly higher ($p < 0.05$), SOD and CAT activities were significantly lower ($p < 0.05$). When medication given groups and sham group were compared; in α -LA group it was found that CAT activity was significantly lower, XO activity was significantly higher ($p < 0.05$). In the combined group just the XO level is significantly higher ($p < 0.05$). Other enzyme activities were not different between medication given groups and sham group ($p > 0.05$). When the control group and medication groups were compared; MDA level was significantly decreased in all medication groups ($p < 0.05$). But, SOD activity was increased ($p < 0.05$). In Q group, XO activity was significantly decreased, but CAT activity was significantly increased compared to control group ($p < 0.05$). In sham group histopathological changes were not observed. The most damage was occurred in the I/R control group, but this changes were not statistically significant ($p > 0.05$).

In conclusion, it is thought that intraperitoneal Q was more than α -LA and combine usage effective in prevention I/R injure. In addition, combined usage had not superior effect on treatment. There are needs for future studies to explain if it would affect histopathological changes.

Key words: Ischemia reperfusion, malondialdehyde, xanthine oxidase, superoxide dismutase, catalase and glutathion peroxidase.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnce bağırsak iskemi reperfüzyon (I/R) hasarı ciddi ve sık görülen klinik bir durum olup birçok etiyolojik etkenin neden olduğu süperior mezenterik arterin (SMA) tıkanmasına bağlı oluşur. Bu durum şiddetli yerel veya yaygın doku hasarıyla sonuçlanır. Bu hasarı takiben çoklu organ yetmezliği (MOF) gelişebilmektedir (1).

Cerrahi kliniklerde sık rastlanılan intestinal İ/R hasarı üzerinde birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Aynı şekilde iskemi patolojisinde rol oynayan hipoksi ve serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin, hücre hasarı üzerindeki etkisini azaltmak için çeşitli maddeler ve ilaçlar denenmiştir (2).

İskemi reperfüzyon hasarının patogenezinin hücrenin hipoksisi ve SOR sorumlu tutulmaktadır. İskemi sırasında dokunun yeterince kanlanamaması, hücrenin çevresinde nötrofillerin toplanmasını artırır ve bu nötrofillerden ortama salınan bazı enzimler kapiller por aralığında genişlemeye neden olmaktadır. Ayrıca hipoksi sonucunda ksantin dehidrogenaz (XDH), ksantin oksidaza (XO) dönüşmekte ve bu enzim reperfüzyon sırasında, SOR'nin sentezlenmesinde rol oynamaktadır. SOR ise hidroksil radikalleri (OH[•]) ile lipit peroksidasyonunu başlatmakta ve hücre membranının lipit yapısını bozarak doku hasarına yol açmaktadır (3, 4).

Normal fizyolojik durumlarda SOR'nin büyük bir kısmı mitokondrial elektron transport zincirinde üretilir. Çünkü vücut tarafından kullanılan oksijenin %95-98'i mitokondride suya indirgenir (5).

Aerobik dokularda üretilen SOR'ne karşı çeşitli savunma mekanizmaları vardır. Katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) gibi enzimlerin yanında; beta karoten, melatonin, α - tokoferol, askorbik asit, ürat, bilirubin, sistein, seruloplazmin, albümin, transferrin, ferritin, haptoglobilin, hemopeksin gibi enzim olmayan moleküller de antioksidan savunmada rol alırlar. Oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulmasıyla hücre hasarı oluşmaktadır (6, 7).

Ancak endojen antioksidan sistemler oksidatif hasara karşı tam olarak etkili olmayabilirler. Örneğin; OH[•] bu detoksifiye edici enzimler tarafından metabolize edilemez (7).

Serbest radikal toksisitesini ortadan kaldırmak için başka antioksidanlar ortama eklemek gerekmektedir. Çalışmamızda kullanacağımız *α -lipoik asit (α -LA)* ve *Quersetin (Q)*'de önemli antioksidan maddelerdir.

Alfa lipoik asit tiyol grubu içeren, antioksidan özelliği olan bir moleküldür. Ditiyolan halkası sayesinde yüksek bir indirgeme özelliğine sahiptir. Diyetle yeterli miktarda bulunmasına rağmen; fizyolojik sistemlerde mitokondride bulunan α -LA sentaz tarafından sentezlenebilmektedir. Vücutta dihidrolipoik aside (DHLLA) indirgenir. DHLLA antioksidan etkisinin yanında özellikle demir varlığında prooksidan etki de gösterebilir (8).

Lee ve arkadaşları, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile lipit peroksidasyonunu uyarak invitro α -LA'nın, lipit peroksidasyonunu inhibe edici etkisini araştırmışlardır. Ancak bu çalışmada lipit peroksidasyonu sabit bir süre sonunda bir kez ölçülmüş ve lipit peroksidasyon fazları ayrıntılı olarak değerlendirilmemiştir. Bu nedenle α -LA'nın lipit peroksidasyonunu engelleme mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (9).

Flavonoidler ve bu grubun bir üyesi olan Q insan sağlığı üzerine yararlı etkileri olan ve başlıca soğan, elma, çay gibi bitkisel gıdalarda bulunan polifenolik bileşiklerdir. Q, singlet oksijen (1O_2), süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), OH^{\cdot} gibi reaktif oksijen ürünlerini yakalayabilmektedir. Böylece lipit peroksidasyonunu önlediği, zincir radikal reaksiyonunu sonlandırdığı, lökosit adhezyonu ve aktivasyonunu azalttığı ve mast hücre degranülasyonunu önlediği, metal iyonlarını şelatlayarak serbest radikal hasarına karşı koruyucu bir etkisi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (10, 11).

Oksidatif stresin azaltılmasında kombine antioksidan tedavisinin tek bir antioksidan ajanın verilmesine göre daha etkili olduğuna dair sınırlı sayıda bilimsel veriler bulunmaktadır. Kombine antioksidan tedavisinin, serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasarı azaltarak insan sağlığı üzerine olumlu etkiler yapabileceği düşünülmektedir (12).

Bu çalışmada SMA'nın geçici klempajı sonucu oluşacak iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde veya azaltılmasında, antioksidan etkisi olduğu bilinen α -LA'nın ve antioksidan, antiinflamatuvar, antimitojenik etkili Q'nin ayrı ayrı ve birlikte koruyucu etkilerinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

2. 1. 1. İskemi

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

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

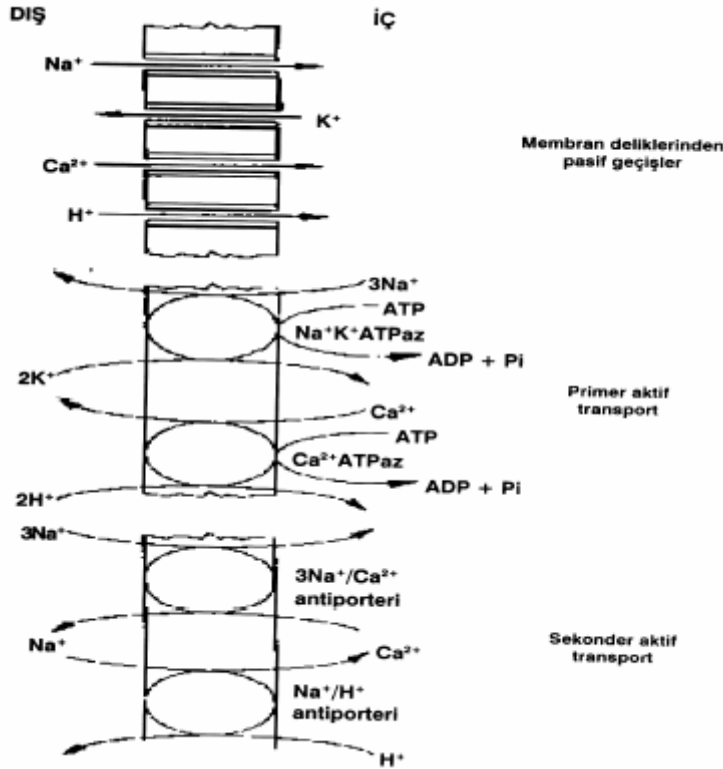
İskemi sonucu oksijenin azalması, krebs döngüsüyle aerobik oksidasyonda azalmaya ve hücrede bulunan adenzin trifosfat (ATP) miktarında düşüşe neden olur. Bu durum adenzin difosfat (ADP) ile fosfat birikimi ve Embden- Meyerhoff yolundaki anaerobik glikolizde artmayla sonuçlanır. Laktik asit ve pürivik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

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

İskeminin ciddiyetine ve süresine göre hücre membranının fizyolojik bütünlüğü bozulmaya başlar. İskeminin ilk etkilediği yer mitokondridir. ATP miktarındaki net azalma Na^+/K^+ ATPaz enzimini inhibe eder. Buna bağlı olarak hücre içi Na^+ ve su artışı ile hücrede şişme meydana gelir. Hücre dışı K^+ miktarı artar. Na^+ un hücre içi artışı ile Na^+/Ca^{+2} ve Na^+/H^+ değişim sistemleri aktive olur. Sonuçta hücre içine Ca^{+2} ve H^+ akışı başlar. Hücre içi Na^+ artışı membranda depolarizasyon yaparak, geçici voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının açılmasına ve hücre içi Ca^{+2} miktarının artmasına neden olur. Hücre içinde Ca^{+2} artması fosfolipazı aktive eder ve fosfolipidlerin parçalanmasına neden olur. Araşidonik asit ortaya çıkar ve böylece serbest radikal oluşturan siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolları aktive olur (16).

Sitoplazmada artan serbest Ca^{+2} , Ca^{+2} 'a bağımlı ATPaz enzimini aktive eder ve hücre içi ATP daha hızlı tüketilir. Yüksek Ca^{+2} seviyeleri mitokondri iç zara etki ederek oksidatif

fosforilasyonu ve ATP yapımını azaltır. Yüksek Ca^{+2} seviyelerinin, proteaz aktivasyonu sonucu XO enziminin iskemik dokuda ortaya çıkmasında, nötral proteazlar ve lizozomal proteazların aktivasyonu ile hücre iskeletini oluşturan protein yapıların yıkılması sonucu geri dönüşümsüz hasarda rol oynadıkları ortaya konmuştur (Şekil 1), (15).



Şekil 1: Hücre membranı normal iyon dengesi (15)

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

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

Hücrelerde belli uyarılarla hücre içi depolardan hücre membranı reseptörü aracılığı ile Ca^{+2} serbestlenmesi gerçekleşmektedir. Agonistin G proteini aracılığı ve fosfolipaz C ile eşlenmiş olarak bulunan reseptöre bağlanması, fosfotidil inozitol bifosfatın diaçilgliserol ve inozitol trifosfat (IP3)'a ayrılmasına neden olmaktadır. IP3, endoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını gerçekleştirmektedir (15).

Hücre içine giren veya intrasellüler olarak salgılanan Ca^{+2} iki şekilde tamponlanmaktadır. Bunlardan birincisi kalmodulin gibi efektör bir proteine veya kalsibindin gibi özel bağlayıcı proteine bağlanarak gerçekleşmektedir. Ca^{+2} negatif gruplara bağlanarak

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

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

2. 1. 2. Reperfüzyon

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

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

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

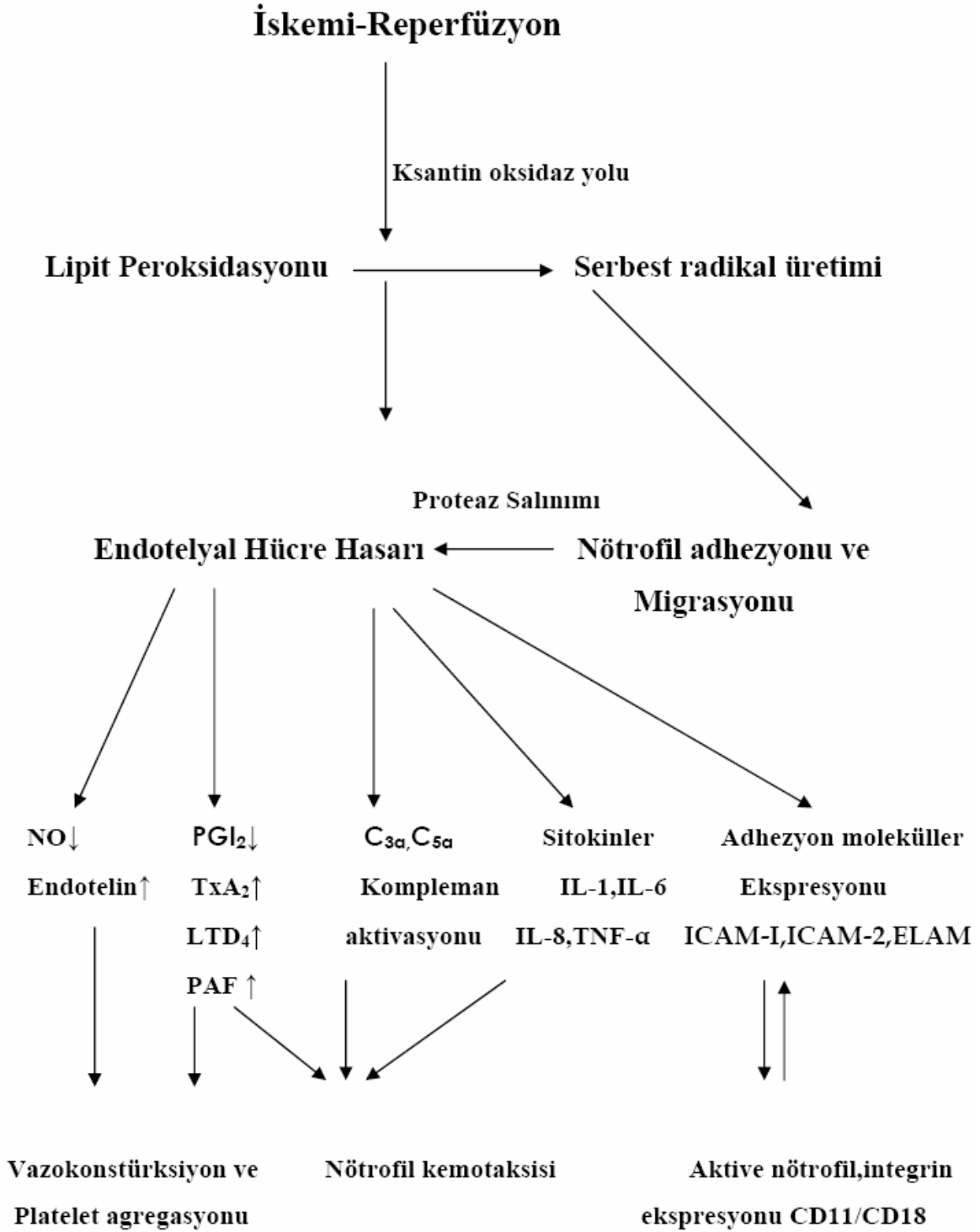
Deneysel çalışmalar, reperfüzyonun akut faz esnasından önceki iskemik doku üzerine ek bir hasar yüklediğini göstermiştir. Reperfüzyon hasarı olarak bilinen bu ardışık olaylar; intrasellüler enzimlerin salınımını artırarak, Ca^{+2} 'un hücre içine girişine, sarkolemmal fosfolipitlerin bozulmasına ve hücre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

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

Sitokinlerin de etkisi ile vasküler yatağı döşeyen endotel hücrelerinde adhezyon moleküllerinin (ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin) salınımı artar ve buna koşut olarak nötrofillerin endotel yüzeyine karşı olan ilgisi fazlaşır. Endotele yapışan nötrofiller daha sonra hücre aralıklarından parankime doğru ilerleyerek fagositoz ve lizozomal enzimlerin de yardımı ile hasarın ilerlemesine yardımcı olurlar. Reperfüzyon hasarı lokal olduğu kadar, sitokinler yoluyla uzak organlarda da inflamatuvar yanıtı indükleyerek organ yetmezliklerine neden olabilir (Şekil 2), (22).

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

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



Şekil 2: İ/R’da endotel hasarı ve lipit peroksidasyonu (25)

2. 1. 3. İskemi Reperfüzyon Hasarında Nötrofillerin Rolü

İskemi sürecinden sonra reperfüze olan bölgeye lökositlerin, özellikle polimorfonükleer lökositler (PMNL) olan nötrofillerin infiltrasyonu reperfüzyon hasarının önemli bir nedenidir

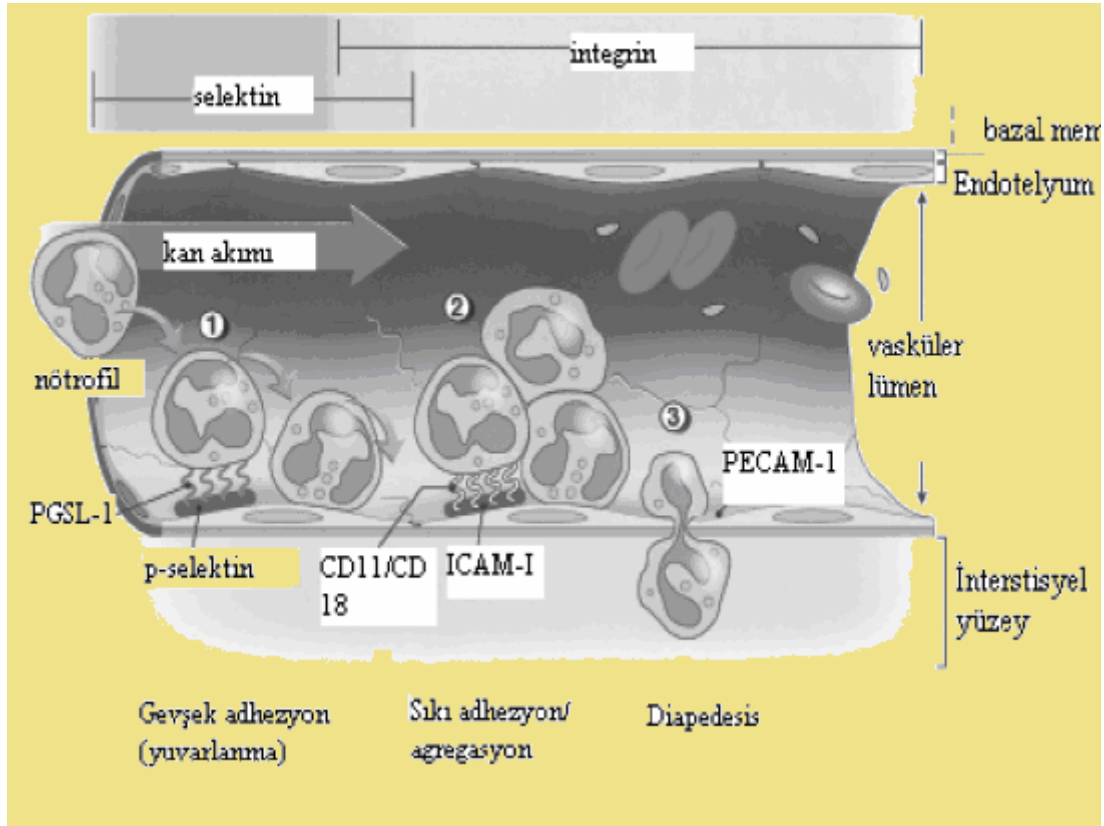
(26). Bilindiği gibi nötrofiller fagositoz olayı ile canlıyı enfeksiyöz ajanlardan koruyan kan hücreleridir. Yapılan çalışmalarda, iskemik hücrelerin, kemoatraktan maddeleri ve adhezyon moleküllerini salgılayarak, nötrofil ve trombositlerin vasküler endotele adhezyonuna dolayısıyla inflamatuvar yanıtı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

Nötrofillerin kemotaksisinde rol alan en önemli olay iskemi sırasında XO reaksiyonu sonucu ortaya çıkan $O_2^{\bullet-}$ 'dir. Diğer ajanlar ise, kompleman 5a (C5a) kompleman 3a (C3a), araşidonik asit metabolitleri, özellikle lökotrien B₄ (LB₄), nitrik oksit (NO), trombosit aktive edici faktör (PAF), interlökin -1, 6, 8, gamma interferon (INF- γ) ve TNF- α gibi sitokinlerdir (29). Kemotaktik faktörlerin sentezi ve salınması ile birlikte, hem nötrofil hem de endotel hücrelerinde lokalize olan adhezyon moleküllerinin artışında başlamaktadır. Nötrofil-endotel etkileşimini sağlayan adhezyon molekülleri, glikoprotein yapısındadırlar. Nötrofiller üzerinde bulunan bazı adhezyon molekülleri; lökosit β 2 integrinler (CD11/CD18) ve lökosit adhezyon molekülü -1 (LAM -1 veya L-selektin) dir. Endotel hücreleri üzerinde bulunanlar ise; intersellüler adhezyon molekülü -1 (ICAM-1), endotelial lökosit adhezyon molekülü-1 (ELAM-1 veya E-selektin) ve P-selektin'dir (28, 30).

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

Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akışının geri dönmemesi, aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçları oluşturduğu bildirilmiştir (31). Nötrofiller bozulan mikrovasküler bariyerden, dokuya geçerken beraberinde damar içi sıvı da dokuya kaçarak, ödem oluşumuna neden olur. Geri dönüşümsüz hasar, bu noktada " No Reflow " fenomeni ile ortaya çıkar. Bu fenomen mikrovasküler bariyerin bozulması ile dokuya kaçan sıvının, interstisyel basıncı arttırarak, kapillerleri sıkıştırması ve kan akımını durdurması şeklinde tanımlanır. Dokudaki kan akımı, kapiller düzeyde engellenerek, hücre beslenmesi bozulur (32).

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



Şekil 3: İskemi reperfüzyondan sonra lökositlerin endotel hücrelere yapışması ve interstisyel alana geçişi (35)

2. 1. 4. Komplemanın Rolü

İskemi reperfüzyon hasarı, kompleman aktivasyonu ve bazı proinflamatuvar mediatörlerin oluşmasına yol açar. Anafilotoksinler (C3a, C5a) ve membran atak kompleksleri (C5b-9) İ/R hasarında önemli bir role sahiptir. Proinflamatuvar mediatörlerden C5a, C3a'dan yaklaşık 20 kat daha potenttir. Ek olarak C5a, lökosit aktivasyonunun ve kemotaksisinin stimülasyonu yoluyla; lökosit-monosit-kemoatraktan protein- 1 (MCP-1), TNF- α , IL-1, IL-6 gibi inflamatuvar ürünlerin artışını sağlar. iC3b, C3b'den oluşur. C5b-9 ve iC3b vasküler hemostazı değiştirebilir. Vasküler endotelial- β 2 integrin, CD11-b ve CD18 lökosit adhezyonu için spesifik bir ligandır. Ek olarak C5b-9 kompleksi, lökosit adhezyon moleküllerinin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu artıran endotelial hücrelerdeki Nükleer Transkripsiyon Faktörü B (NFkB)'yi aktive eder. Vasküler sellüler adhezyon molekülü (VCAM-1), ICAM-1, E-Selektin, P-Selektin gibi endotelial lökosit adhezyon molekülleri komplemandan etkilenir. C5b-9, lökosit aktivasyonu ve kemotaksisini endotelial IL-8 ve MCP-1 salınımı yolu ile tetikler. Sonuç olarak C5b-9 endotelial relaksasyon ve endotelial siklik guanozin monofosfat (cGMP)'yi

azaltarak vasküler tonusta değişikliğe neden olur. Sonuçta kompleman aktivasyonu iskemik organlarda vasküler hemostazı değiştirip kan akımında değişikliklere ve lökositin endotele adhezyonun artmasına neden olabilir (36).

2. 1. 5. Mast Hücrelerinin Rolü

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

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

2. 2. İNCE BAğIRSAK İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

İnce bağırsak İ/R hasarı ciddi ve sık görülen klinik bir durum olup birçok etyolojik etkenin neden olduğu SMA'nın tıkanmasının sonucudur. Bu durum şiddetli yerel veya yaygın doku hasarıyla sonuçlanır. Bu hasarı takiben MOF gelişebilir. Mezenterik dolaşım bozukluğu, arteriyel tromboz, emboli, Henoch-Schonlein purpurası, dissemine intravasküler koagülasyon gibi damar içi veya volvulus, invaginasyon, boğulmuş kasık fitiğı, tümör, fibrotik bant gibi damarlara dışarıdan bası yapan nedenlerle ince bağırsak iskemisi oluşmaktadır. Ayrıca sistemik hipertansiyon, vazokonstriksiyon, kan viskozite bozukluğu, ateroskleroz ve hipotansiyon gibi damar içi tıkanıklık oluşturmeyen nedenlerde ince bağırsak iskemisine yol açmaktadır (1).

Etyolojik neden ne olursa olsun akut bağırsak iskemisinin prognozu kötü olup mortalite oranı %25-75 arasındadır. Bütünüyle mezenterik kan akımına bağlı olan ince bağırsaklar bazı

bölgelerinde karın arka duvarıyla damarsal bağlantıları olan kalın bağırsağa göre iskemiden daha çok etkilenir (39).

İnce bağırsakların mukozası gelen kan akımının yaklaşık yarısını alırken, bağırsak duvar kalınlığının yarısını oluşturan muskularis propriya toplam kan akımının %10-15'ini almaktadır. Bu nedenle ince bağırsakların mukoza ve submukozaları iskemiye kalın bağırsaklara oranla daha duyarlıdır. Arteriyel tıkanmada, komşu normal bağırsak dokusundan keskin bir sınırla ayrılma söz konusudur. Venöz tıkanmada ise sınırlar belirgin değildir (40). İskeminin şiddetine göre bağırsak duvarındaki hasarın düzeyi tüm bağırsak tabakalarını içeren transmural enfarktüstün, kas tabakasını sağlam bırakarak sadece mukoza ve submukozayı etkileyen mural enfarktüse, muskularis mukozadan daha derine uzanmayan mukozal enfarktüse kadar değişir. İskemik hasar genelde içeride mukozadan başlayıp dış yüzeye doğru ilerler. Histopatolojik olarak ödem, villuslarda yassılaşma, interstisyel kanama, nekroz ve mukozanın parçalanması gözlenir. Bağırsak bakterileri 24 saat içinde gangrene ya da perforasyona neden olurlar. İskemi mural veya mukozal tabakayı etkilediğinde bu bölgelerde özgün çok odaklı tutulum gözlenir. Bağırsak mukozasında kanamalı ve ödemli bir kalınlaşma, bazen de yüzeysel ülserasyonlar görülür (39).

Klinik tabloda bağırsak kan akımının azalmasından hemen sonra sıklıkla şiddetli ve aralıklı karın ağrısı gelişir. Dışkı çıkışı yavaşlar, bazen tabloya rektal kanama ve kusma eşlik edebilir. Genellikle şiddetli ağrı atakları arasında ağrısız dönemler de vardır ve bu sırada fizik muayenede kayda değer bulgular görülmez. Dinlemekle bağırsak seslerinin arttığı duyulur. İlerleyen saatlerde karın ağrısının şiddeti azalır, ancak sürekli ve yaygın bir hal alır. Fizik muayenede karında yaygın hassasiyet vardır. Bu evrede dinlemekle bağırsak sesleri duyulmaz. Bağırsakta nekroz gelişmesiyle birlikte sıvı, protein ve elektrolit kaybı başlar (41). Yaygın peritonit tablosu gelişir. Sıvı ve elektrolit dengesindeki bozukluk sonucu hastanın genel durumu iyice kötüleşir ve şok dönemine girilir. Tedavi edilmediği takdirde ölüm oranı oldukça yüksektir (39).

Sıklıkla bağırsağın neovaskülarizasyonu için bir kaç hafta gereklidir. Bu süre genellikle sürgün ve malabsorpsiyonla birlikte dir. Sıklıkla mukozal ülserasyon ve lümen içine kanama görülür ki, bu durumda nadiren yaşamı tehdit eden kan transfüzyonuna ihtiyaç olur. Mukozal lezyonların bundan sonraki fazı intestinal strüktür gelişmesi ve bağırsaklarda mekanik tıkanıklıktır (42).

Bu hastalardaki yüksek mortalite ve morbidite nedeniyle, araştırmacılar dikkatlerini doku nekrozundan korunmak ve organ fonksiyonlarını geri kazanmak için iskemik dokunun kan akımını onarma üzerine yoğunlaştırmışlardır. Ancak son zamanlarda, iskemi döneminden sonra kan akımı onarımının, yani reperfüzyonun, iskemik organları geç hücre sel nekroz riskine maruz

biraktığı ve bu nedenle fonksiyonun geri kazanımını sınırladığı ortaya çıkarmıştır. Reperfüzyon hasarı geçici intestinal iskemi döneminden sonra ortaya çıkmakta ve hipoksinin meydana getirdiği doku tahribatını artırmaktadır (43).

Kan damarlarının iç yüzeyini döşeyen endotel hücreleri İ/R hasarının zararlı etkilerine karşı oldukça hassas bir yapıya sahiptirler. Uzamış hipoksinin membran potansiyelini değiştirdiği, iyon dağılımını bozduğu, hücre içi hacmi artırıp 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 (adhezyon molekülleri ve sitokinler), diğerleri (nitrik oksit sentaz ve trombomodulin) baskılanır. Endotel hücrelerinin hipoksiye yanıtları reperfüzyon ile artırılır. Sonuç olarak reperfüzyon sonrası erken dönemde, belirgin yapısal hasarlanma olmaksızın endotel hücre işlevi önemli ölçüde bozulur. Uzamış iskemi sonrası reperfüzyona eşlik eden morfolojik değişiklikler, hücre şişmesi, pinositoz, veziküllerinin kaybı, endotel hücrelerinin alttaki bazal membrandan ayrışması ve endotel hücre yüzeyine aktive lökositlerin (öncelikle nötrofiller) yapışmasıdır. Reperfüzyon sırasında aniden ve çok miktarda O₂ sisteme katılır. Reperfüzyon sonrası erken dönemde gözlenen en belirgin değişiklikler ise SOR artışı ve NO azalmasıdır (42).

İntestinal hipoksi ve iskemiye takip eden reperfüzyon bağırsak mukozasında destrüksiyona neden olurken ayrıca SOR salınımına ve sonuçta diğer faktörlerle bir araya gelerek mukoza hasarına neden olur. İnflamasyon ve doku rejenerasyonu; reperfüzyonu izleyen ve lökositlerin oluşturduğu immün hücrelerle oluşur. Özellikle PMNL'de ki mediyatörler SOR ürünlerine katkıda bulunur. PMNL aktive olduğunda salgıladıkları mediyatörlerle doku hasarını artırır, bu süreç reperfüzyondan sonraki organ ve vasküler fonksiyonların değerlendirilmesinde önemli role sahiptir (44).

2. 3. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞUMU

Serbest radikaller aerobik hücrede metabolik süreçlerde üretilirler. Fazla miktarda üretildiklerinde lipit, protein, karbonhidrat ve deoksiribonükleik asit (DNA) gibi hücre içi biyomoleküllerin fonksiyonlarında istenmeyen etkilere neden olurlar. Biyomoleküllere sadece serbest radikaller değil, radikal olmayan reaktif oksijen türleri ve nitrojen türleri de etki etmektedir (45).

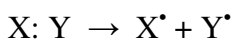
Atom; proton, nötron parçacıklarını içeren çekirdek ve çekirdeğin çevresinde bulunan başka atomlarla kimyasal bağ yapma özelliğine sahip negatif yüklü elektronlardan oluşur.

Çekirdek etrafında bulunan elektronun pozisyonu her zaman kesin lokalize olmayabilir, ancak uzaydaki konumu yaklaşık olarak bellidir. İşte bu elektronun çekirdek çevresinde bulunduğu enerji düzeylerine yörünge denmektedir. Her bir yörünge için enerji değerine kuantum düzeyi denir ve k, l, m, n, şeklinde gösterilir. Çekirdeğe en yakın düzey olan k düzeyi en düşük enerji değerine sahiptir. Atomun en dış kısmında bulunan elektronlar ise en yüksek enerjili elektronlardır. Atomda en aktif olan ve kimyasal tepkimelerinin çoğunun olduğu yer de bu en dış kısımdır. En dışta bulunan elektronların atomdan uzaklaşması veya yörüngeye bir elektron eklenmesi sonucunda iyonlar oluşur. Atom elektron kaybederse pozitif, kazanırsa negatif yüklü iyon olur. Her bir yörüngede en çok iki elektron bulunur. Eğer bir yörüngede tek elektron bulunur ise o elektron eşleşmemiş olarak adlandırılır. Bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektronu bağımsız bulundurma yeteneği olan herhangi bir molekül, iyon ya da bileşik serbest radikal olarak adlandırılır (46).

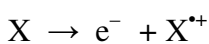
Serbest radikaller kimyasal sembollerinin üst tarafına konulan nokta ile gösterilirler. Örneğin $O_2^{\bullet -}$: süperoksit anyon radikali, OH^{\bullet} : hidroksil radikali (47). En basit serbest radikal sadece bir eşleşmemiş elektron içermesi nedeni ile hidrojen atomudur. Biyolojik moleküllerin çoğu eşleşmiş elektron içerdiğinden radikal değildir. Atomlar son elektron yörüngeleri doluyken ya da boşken kararlı yapılardır. En dış yörüngelerini tamamen doldurmak ya da boşaltmak amacıyla elektron alışverişi, paylaşımı yaparlar. Bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron varlığı nedeniyle genelde serbest radikaller oldukça reaktiftirler. Radikallerin kimyasal reaktiviteleri oldukça geniş bir spektrumda değişkenlik gösterir. Genellikle radikal olmayan maddelere göre daha reaktif olduklarından eşleşmemiş elektronlarını paylaşmak için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerek bu moleküllerden elektron alır ya da verirler. Bu şekilde kendi aralarında da etkileşime girebilirler. İki serbest radikalın birleşmesi sırasında eşleşmemiş elektronları da birleşerek bir çift oluşturur. Böylece her iki radikal ortadan kalkar. Ancak organizmada bulunan moleküllerin çoğu eşleşmemiş elektron içermediğinden serbest radikaller çoğu zaman radikal olmayan maddelerle tepkimeye girerek yeni serbest radikaller oluşturur. Bu olaylar zincir tepkimeler olarak sürme eğilimindedir (45, 48).

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşmaktadır:

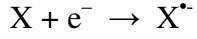
Bir molekülü oluşturan kovalent bağın hemolitik yarılmaması ve eşleşmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması sonucu:



Bir molekülün elektron kaybetmesi sonucu:

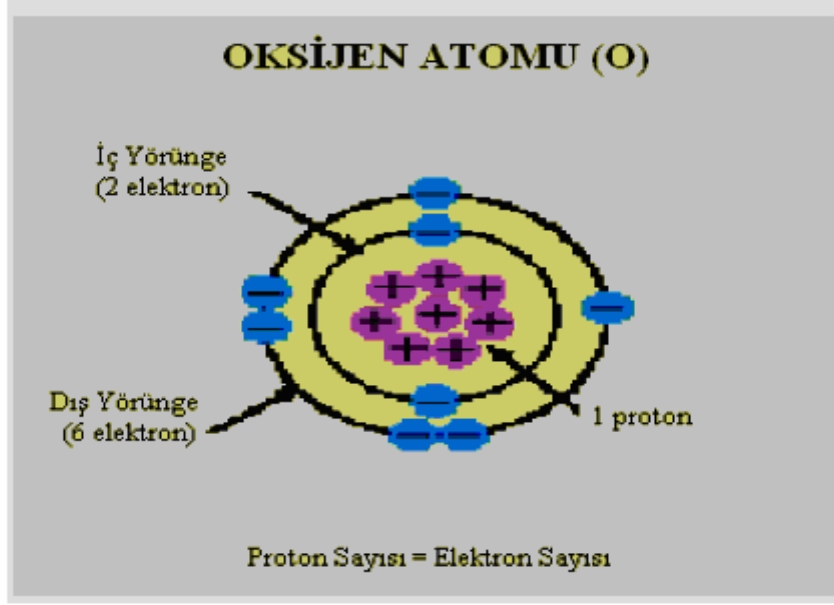


Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi sonucu: (49)

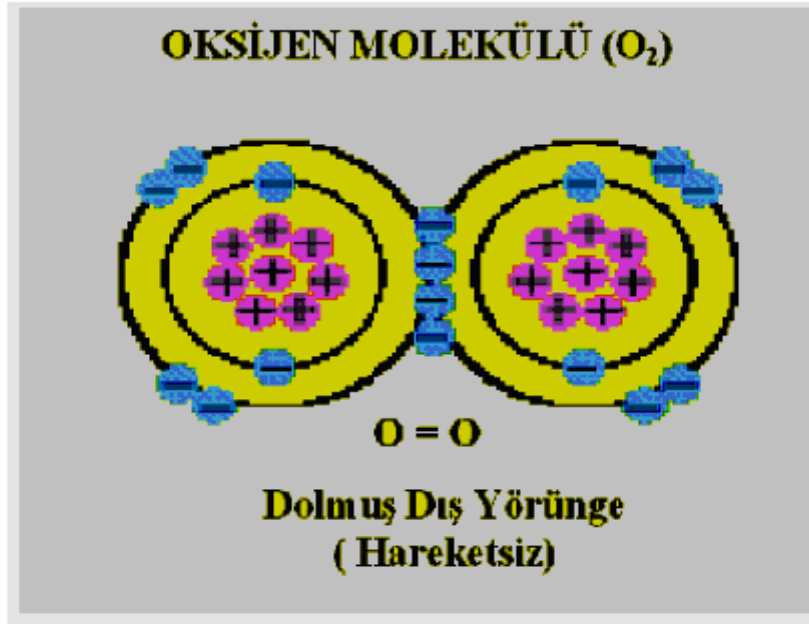


2. 3. 1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen 8 atom numaralı doğada dioksijen (O_2) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısıyla ilişkilidir (Şekil 4, 5), (50, 51).



Şekil 4: Oksijen atomlarının yapısı (52)



Şekil 5: Oksijen moleküllerinin yapısı (52)

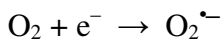
Oksijen molekülündeki aynı yöne dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde “singlet oksijen” oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse “oksijen radikali” elde edilir. Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdaki kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler. Bu özellikleri ile reaktif oksijen partikülleri radikaller ve radikal olmayanlar olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir (Tablo I), (50, 51).

Tablo I: Oksijen türevi bileşikler (49)

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

2. 3. 1. 1. Süperoksit Radikalleri (O₂^{•-})

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

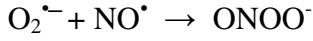


Mitokondrial elektron transport zinciri sırasında O₂'nin otooksidasyonu sonucu oluşur. Süperoksit radikali O₂ varlığında XO'nun ksantini veya hipoksantini indirgemesiyle oluşabilmektedir. NADPH'ın NADPH oksidaz ile oksidasyonu, mitokondrial elektron transport sisteminde NADH₂ ve FADH₂'nin NAD ve FAD'a dönüşümü sırasında, O₂'nin iyonize radyasyonla, sit p450 ile ve arginin veya tetrahidrobiopterin eksikliğinde nitrik oksit sentaz (NOS)'la indirgenmesiyle oluşur (53, 54).

Normal metabolizma sırasında sürekli olarak oluşan O₂^{•-} organizmada şu reaksiyonlara girebilir:

Süperoksit radikalleri SOD ile dismutasyona uğrayarak H₂O₂ oluşturabilir. İki O₂^{•-} birbiri ile etkileşerek biri yükseltgenirken diğeri indirgenmekte böylece H₂O₂ ve O₂ meydana

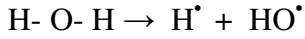
gelmektedir. $O_2^{\cdot-}$ ortamdan bir proton alarak perhidroksi radikali (HO_2^{\cdot}) oluşturabilir. HO_2^{\cdot} süperoksit radikalinden çok daha reaktiftir, örneğin membrandaki yağ asitlerinin peroksidasyonunu başlatabilir. $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 demir iyonu katalizörlüğünde OH^{\cdot} oluşturabilir ve bu tepkime de demir-katalizörlü Haber-Weiss reaksiyonu adını alır. Bu reaksiyonlar metal şelatörü ajanlarla inhibe edilebilir. Süperoksit radikalleri enzimatik olmayan dismutasyon veya Haber-Weiss reaksiyonu sırasında singlet oksijen (1O_2) yapımına neden olabilir. 1O_2 süperoksit toksisitesine aracılık edebilmektedir. $O_2^{\cdot-}$ NO^{\cdot} ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturabilir. Peroksinitrit çok daha reaktif ve sitotoksik bir türdür.



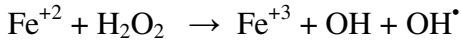
Süperoksit radikalleri, fenoksil radikalleri ile reaksiyona girebilir ve protein yapısında modifikasyona neden olabilir. Fenoksil radikali, fenollerin oksidasyonu sonucu oluşur, organizmadaki başlıca fenol kaynakları tirozin ve E vitamindir (55, 56).

2. 3. 1. 2. Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})

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



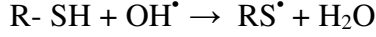
Hidrojen peroksidin Fe^{+2} veya Cu^{+2} ile reaksiyona girmesiyle de HO^{\cdot} oluşmaktadır. H_2O_2 toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde bu oluşan HO^{\cdot} olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiş ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.



Hidroksil radikalleri başta lipit, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücrel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. HO^{\cdot} DNA'da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan ürünlerin bazılarının mutojenik oldukları görülmüştür. Yine OH^{\cdot} aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olurlar. Örneğin: Timine katılarak timin radikalini oluşturur ve bu radikal oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil radikaline dönüşmektedir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen OH^{\cdot} DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik

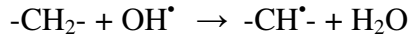
kırılmalarına neden olur. Hasar çok kapsamlı olursa hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir (57, 58).

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

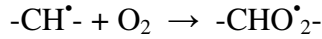


Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O₂ ile kombine olabilir ve oksisülfür radikallerini oluşturur. RSO₂[•] ve RSO[•] gibi bunların birçoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar.

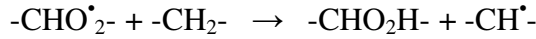
Hidroksil radikalının sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipit peroksidasyon olayıdır. HO[•] membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asit gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinden -C-atomunun birinden H atomunun çıkartılması ve su oluşumu şeklinde gerçekleşir.



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



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



Lipit hidroperoksit

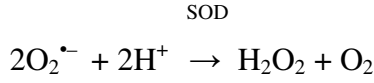
Böylece hidroksil radikalleri, yüzlerce yağ asitlerinin yan zincirlerini lipit hidroperoksitlere dönüştürür. Membranda lipit hidroperoksitlerinin birikimi membran fonksiyonunu bozar. Peroksil radikaller ve sitotoksik aldehitler, membran proteinlerinde ciddi bir hasara neden olurlar ve membrana bağlı bazı enzimleri ve reseptörleri inaktive ederler (59, 60, 61).

2. 3. 1. 3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya O₂^{••}'nin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek H₂O₂'yi meydana getirir (62).

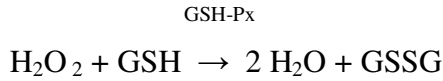
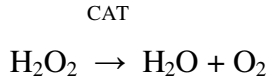


Ancak, biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl üretimi $O_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyonu ile olmaktadır. Bu dismutasyon spontan olarak veya SOD enzimi aracılığıyla katalizle olabilir:



Hidrojen peroksit gerçekte bir serbest radikal türü olmamasına rağmen; serbest elektron içermesi, serbest HO^{\bullet} oluşturabilmesi ve hücrel membranlara kolaylıkla girebilmesi nedeniyle önem kazanmaktadır. H_2O_2 , geçiş metal iyonlarının varlığında kolayca parçalanarak en reaktif ve en toksik oksijen radikali olan HO^{\bullet} oluşturmaktadır. H_2O_2 ; OH^{\bullet} üretmek suretiyle canlı sistemlerde önemli hasarlara sebep olduğu için, H_2O_2 akümülyasyonunun kontrolü hücreler için biyolojik olarak önemlidir (62, 63).

Süperoksit dismutaz aktivitesi sonucu ortaya çıkan H_2O_2 ; CAT ve GSH-Px enzimleri ile su ve oksijene dönüştürülür:



2. 3. 1. 4. Singlet $O_2 (^1O_2)$

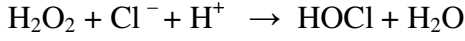
Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal değil ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. 1O_2 , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi $O_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyonu ve H_2O_2 'nin HOCl ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça olduğu tespit edilmiştir. SOR etkisiyle peroksil radikalleri (ROO), alkoksil radikalleri (RO) karbon merkezli radikaller (R) veya tiol radikalleri (RS) oluşur. Bu radikaller oksijenle tekrar reaksiyona girerek yeni serbest radikaller üretirler (64).

2. 3. 1. 5. Hidroperoksil Radikali (HO_2^{\bullet})

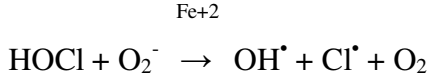
Hidroperoksil radikali, $O_2^{\bullet-}$ protonlanmasıyla oluşur. $O_2^{\bullet-}$ 'den daha güçlü bir oksidandır. Biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesi önemlidir (64).

2. 3. 1. 6. Hipokloröz asit (HOCl)

Aktif nötrofillerde oluşan güçlü bir oksidandır. Nötrofil sitoplazmasında bulunan "hem" içeren bir enzim olan myeloperoksidaz etkisi ile H_2O_2 ve klorür iyonlarından HOCl oluşur (64).

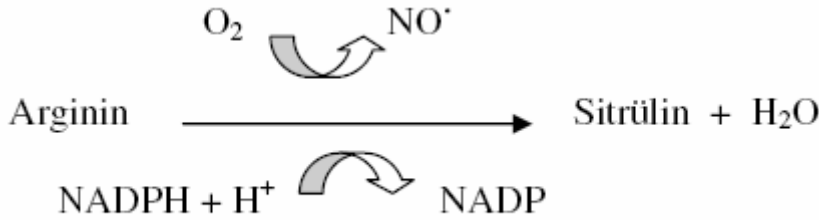


Hipokloröz asit Fe^{+2} bağımlı ve Fe^{+2} bağımsız bir reaksiyon ile OH^\bullet oluşumunu arttırabilir.



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

Memeli hücrelerinde NO başlıca NOS'ın aktivitesi sonucu sentezlenir. NOS, oksijeni kullanarak L-arginin amino asitinden sitrüllin ve NO'yu oluşturur. Bu olay, NADPH, flavin mononükleotit (FMN), flavin adenin dinükleotit (FAD), tetrahidrobiopterin (BH4) ve kofaktör olarak bir tiyol donörüne ihtiyaç duyar (65).



Yarılanma ömrü, moleküler oksijen ile hızlı reaksiyonundan dolayı atmosferik şartlar altında oldukça kısadır. Kan basıncı, guanilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Nötrofiller tarafından üretilen O_2^\bullet oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (66). NO'in aşırı üretimi toksik etkili olabilir. NO'in kimyasal olarak aktivitesi yüksek değildir ancak belli şartlar altında oldukça toksik ürünler oluşturabilir. NO ve süperoksitin reaksiyona girmesiyle peroksinitrit meydana gelir. Peroksinitrit, direkt olarak proteinleri hasara uğratar ve OH^\bullet , azot dioksit (NO_2^\bullet) ve nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşür (67).

2. 3. 2. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

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

moleküler otooksidasyon yapan tiol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluştururlar (68, 69).

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

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

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1–5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrojenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Fizyolojik olarak reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı normal oksijen metabolizmasıdır. Dolayısıyla fizyolojik koşullar altında mitokondrial elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır (70).

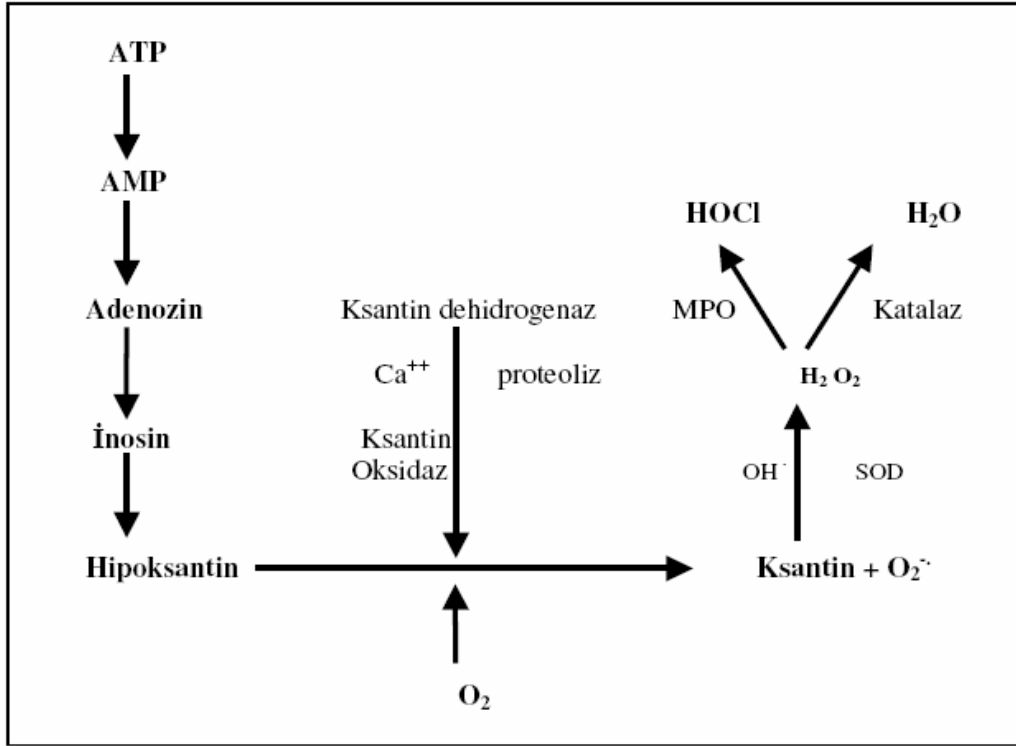
2. 3. 2. 1. 2. Araşidonik Asit Kaskatı

Araşidonik asit siklooksijenaz ve lipooksijenaz ile metabolize olarak prostoglandin, prostosiklin, tromboksan ve lökotrienleri içeren çeşitli vazoaktif ürünleri oluşturur. Siklooksijenaz, iki molekül oksijenin doymamış yağ asidine katılmasını katalizler ve prostoglandin G (PGG) oluşturur. PGG hızla prostoglandin H (PGH)'ye okside olur, bu sırada $O_2^{\cdot-}$ oluşur. Lipooksijenaz yoluyla da OH^{\cdot} radikalleri oluşabilir (71, 72).

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

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

Bu enzim, sağlıklı hücrelerde NAD^+ bağımlı dehidrojenaz (XDH, D formu) halinde bulunur. Enzimin bu formu pürinlerin oksidasyonu sırasında elektron alıcısı olarak O_2 yerine NAD^+ kullanır ve SOR üretmez. İskemi sırasında XDH, oksidan üreten XO (D den O ya dönüşüm) formuna dönüşür (Şekil 6), (19).



Şekil 6: XD-XO'a dönüşümü ve serbest oksijen radikallerinin oluşumu (73)

İskemi sürecinde, hücre içindeki ATP, hipoksantin ve ksantine dönüşerek hücre sel enerji miktarında azalmaya neden olur. Hipoksantin ve ksantin, XO için iyi birer substrattırlar. Reperfüzyonun başlaması ile ortama katılan O₂, iskemik süreçte birikmiş olan hipoksantin ve ksantin, XO aracılığı ile reaksiyona girerek, O₂⁻ ve H₂O₂ açığa çıkarır.

XDH dan XO'a dönüşüm 2 yolla gerçekleşir:

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

İskeminin yol açtığı D den O ya dönüşüm farklı organlarda farklı hızlarda gerçekleşir. Bağırsak ve karaciğerde bu dönüşüm, çok kısa süreli iskemilerde bile olabilirken, iskelet kası ve deride daha uzun süreler gerektirir. Oluşan XO miktarı iskemi süresi ile doğru orantılıdır; iskemi süresi arttıkça oluşan XO miktarı da artar (74).

Ksantin oksidaz enziminin, meme epitel hücrelerinde kapiller endotel hücrelerinde yoğunlaştığı, kapiller endotel hücrelerindeki XO aktivitesinin aynı dokudaki diğer hücrelerden 100 kat fazla olduğu tespit edilmiştir (75). XO'ın bu lokalizasyonu, İ/R hasarı için ayrı bir önem taşımaktadır.

Reperfüzyonun başlaması ile endotel hücreleri O₂ ile ilk temas eden hücreler olur. Bundan dolayı kapiller endotel hücreleri, reperfüzyon hasarından ilk etkilenen hücrelerdir. Bu neden ile SOR'nin ana üretim merkezi olmaları muhtemeldir. Kapiller endotel hücrelerinin hasarı bir kemotaktik stimulus halini alır (76).

2. 3. 2. 1. 4. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulumda buluna sitokrom P-450 O₂ kullanarak birçok substratı oksitler. O₂ bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır. Kimyasal ajanların serbest radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur. Son durumda bir elektron eksikliği vardır ve elektrofilik bileşik oluşur. Oluşan bu elektrofilik ürün bir nükleofil ile reaksiyona girer. Bu elektrofilik bileşiği çeken en önemli bileşik sistein kalıntıları üzerindeki tiyol (-SH) grubudur. Tiyol grubu ise pek çok endojen makromolekülde (DNA, RNA, enzimler gibi) bulunduğu için reaktif ara ürünler bu moleküllerle kovalent bağlanarak toksisite gösterebilirler (49).

2. 3. 2. 1. 5. Peroksizom

Çok uzun zincirli yağ asitlerinin yıkılmasından sorumlu organeller olan peroksizomlar, amino asid oksidaz, urat oksidaz gibi oksidan enzimlerce zengindirler ve güçlü H₂O₂ kaynağı olarak kabul edilirler (77).

2. 3. 2. 1. 6. Plazma Membranı

Membranlarda bulunan doymamış yağ asitleri ve proteinler serbest radikal hasarına açıktır. Serbest radikallerin başlattığı lipit peroksidasyonu; transmembran iyon gradientinin bozulmasına, sekretuar fonksiyon kayıplarına ve hücrel metabolik olayların inhibisyonuna yol açar (77).

2. 3. 2. 1. 7. Otooksidasyon

Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinlerin oto oksidasyonu sonucunda radikal oluşabilir (78).

2. 3. 2. 1. 8. Redoks Döngüsü

Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Menadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin, gibi bileşikler alternatif bir redoks

siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikalini oluştururlar (79). Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intrasellüler ferritin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan OH^\bullet gibi ikincil radikallerin olduğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar (57).

2. 3. 2. 1. 9. Fagositoz

Radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırlar. Aktive fagositler intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar. Aktive olmuş fagositlerde üretilen serbest radikaller patojenlerle savaşta önemli rol oynar (Tablo II), (80).

Tablo II: Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler

Trombositler	H_2O_2 , O_2^\bullet , OH^\bullet
Nötrofiller	H_2O_2 , O_2^\bullet , OH^\bullet , HOCl
Eozinofiller	H_2O_2 , O_2^\bullet , OH^\bullet , HOCl ,
Makrofajlar	H_2O_2 , O_2^\bullet , OH^\bullet , HOCl , NO^\bullet

Kan monositleri, doku makrofajları (kupfer hücreleri, alveolar makrofajlar) gibi fagositik hücreler ve nötrofiller, eozinofiller, bazofiller gibi granülositler immunojenik veya özel bir uyarı ile uyarıldıktan sonra lizozomlarını dışarı vermeye başlarlar. Reaktif oksijen oluşumunun yanısıra, mitokondri dışındaki oksijen üretiminde bir patlama (respiratory burst) olur. Fagosit edilmiş, patojenler oksidan ajanlar tarafından öldürülür. Solunum yolu ile patlamanın amacı oksidan ajanlar sağlamaktır. Oluşan oksidan ajanlar patojenleri öldürmenin yanısıra myeloperoksidaz sistemine de etki eder. H_2O_2 ve HOCl kombinasyonu myeloperoksidaz sistemini etkileyerek de güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterir. Bu radikaller memeli bakteri ve parazitlerine karşı sitotoksik etkiye sahip oksidan ajanlardır. Membran peroksidasyonu, membran proteinlerinin dekarboksilasyonu ve/veya oksidasyonuna yol açıp membran bütünlüğünü bozabilir ve DNA'yı okside ederek parçalayabilir. Fagositik kaynaklı oksidan ajanlar; ototoksik, immunosupresif ve mutajenik etki oluşturabilirler (80).

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

Serbest radikaller, eksojen nedenlerle de oluşabilir. Radyasyon, sigara dumanı, zehirli gazlar, bazı ilaçlar, kanserojen maddeler ve pestisitler en önemli eksojen serbest radikal üretim kaynakları olarak bilinirler (81).

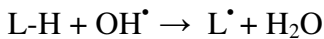
2. 3. 3. Serbest Radikallerin Etkileri

2. 3. 3. 1. Hücre içi etkileri

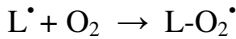
2. 3. 3. 1. 1. Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikal hasarının esas süreci lipit peroksidasyonu olarak kabul edilmektedir. SOR, özellikle OH[•] pek çok organik bileşiğin doymamış bağlarına saldırarak etkisini göstermektedir. Biyolojik zarlar hücreleri ve hücre organellerini çevreleyen, lipit ve proteinlerden oluşan yapılardır. Çift tabaka fosfolipit arasına gömülü halde bulunan proteinler enzim, reseptör, taşıyıcı molekül olarak pek çok hücresel işlevde yer almaktadır. Biyolojik zarlar büyük miktarlarda yan bağlı çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içerirler ve serbest radikal hasarına karşı çok hassastırlar. Hücre zarının işlevlerini gerçekleştirebilmesi akışkanlığına bağlıdır. Akışkanlık ise büyük ölçüde PUFA varlığıyla sağlanmaktadır. PUFA'ların hasarında zarın akışkanlığının da azaldığı gösterilmiştir (46).

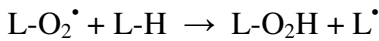
Zara yapışık poliansatüre yağ asitleri özellikle OH[•] tarafından saldırıya uğrar ve yağ asidi yan zincirinden (L-H) bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile lipit peroksidasyonu başlar.



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



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

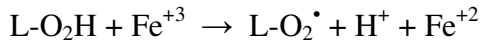


Oluşan serbest radikaller zincir reaksiyonu şeklinde yeni serbest radikaller oluştururlar (46).

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

Zarın akışkanlığını değiştirerek iyon pompalarını ve reseptörlerin bağlanmasını etkileyebilir. Zar lipidlerinin hidrolizi fosfolipaz A₂'yi uyarabilir, bu da reseptör fonksiyonlarını etkiler. Artan zar geçirgenliği nedeniyle kalsiyum homeostazisi değişebilir ve ATPaz'ların kalsiyumu tutması azalabilir (82).

Sonunda plazma membranının bütünlüğünün kaybıyla hücre ölümü ve doku nekrozu gerçekleşebilmektedir. Zincirleme serbest radikal reaksiyonları sırasında ortamda demir ve bakır gibi metal iyonları bulunmadığında ortaya çıkan lipid hidroperoksit ve ürünleri oldukça kararlı bileşiklerdir. Metal iyonları ve onların kompleksleri lipid hidroperoksitleri parçalayarak lipid peroksidasyonu oluşturmaktadır (46).

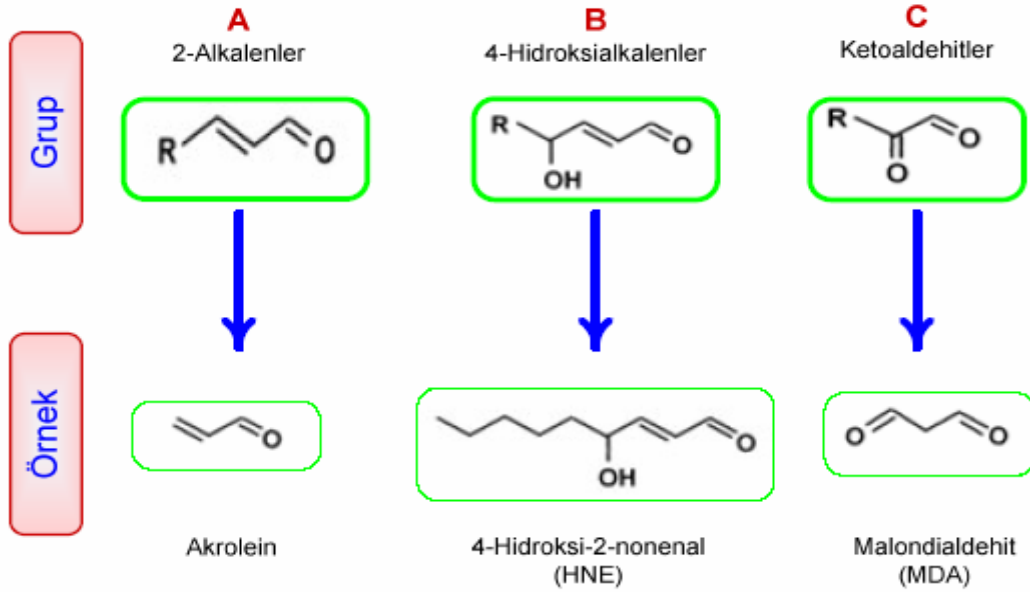


Lipit peroksidasyonu, lipid peroksitlerinin malondialdehit (MDA) ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona erer (82).

Malondialdehit ölçümü lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu bileşiğin miktarının saptanmasında tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin (TBARS) ölçümü yapılmaktadır. Bu oldukça nonspesifik olmasına rağmen MDA tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır (83).

Peroksidasyon sonucu oluşan reaktif aldehitler serbest radikallere göre daha stabildirler ve hücre içinde veya hücreden dışarıya çıkararak daha uzaktaki bölgelerdeki proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipitler ve nükleik asitlerle reaksiyona girebilir. Bunun sonucunda molekül içi ve moleküller arası 1-amino-3-imino propen (AIP) köprüleri kurabilir ve biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlar oluşturabilir (Şekil 7), (84).

Üç karbonlu bir ketoaldehit olan MDA, normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra krebs siklusu ile karbondioksite indirgenerek atılır. Fakat aşırı lipid peroksidasyonunda MDA konsantrasyonu artar ve dokulara hasar verir (85).



Şekil 7: Lipit peroksidasyonu ile oluşan aldehitler (84)

2. 3. 3. 1. 2. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin hücre çekirdeğinde ve DNA'da etkileri genotoksik ve mutajenik değişikliklere yol açar. DNA'nın nükleik asitleri ile reaksiyona giren serbest radikaller, DNA dizininde çatlaklar meydana getirerek bu hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine neden olurlar. Oksidatif DNA hasarı, büyük ölçüde yaşlanma ve kanser gelişimine katkıda bulunur (86, 87).

2. 3. 3. 1. 3. Proteinlere etkileri

Serbest radikallerin çift bağ ve tiyol içeren moleküllerle reaktivitesinin yüksek olmasından dolayı; triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metyonin ve sistein aminoasitleri serbest radikal hasarına duyarlıdır. Yapısında veya katalitik aktivitesinde bu aminoasitlerin yer aldığı enzimler radikal etkisi ile inhibe olurlar. Ayrıca radikal etkisi ile sitoplazmik ve membran proteinlerinde çapraz bağlanmalar ve agregat oluşumu görülür Normalde modifikasyonlara dirençli olan prolin, lizin gibi aminoasitler, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve OH^{\cdot} radikallerinin etkisi ile non-enzimatik olarak hidroksilasyona uğrayabilirler (88).

2. 3. 3. 1. 4. Karbonhidratlara etkileri

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

önemli bir mukopolisakkaridi olan hiyalüronik asidin serbest radikallerle etkileşerek bağ dokusunun durağanlığının bozulmasına ve sıvının akışkanlığının kaybına neden olur (88).

2. 3. 3. 2. Hücre Dışı Etkiler

2. 3. 3. 2. 1. Kemotaksi

Serbest radikaller, endotel hücrelerinden kemotaktik faktör ya da proinflamatuvar moleküller olarak adlandırılan histamin, platelet aktive edici faktör (PAF), LTB4 salınımına yol açarlar. Bu kemotaktik faktörlerin etkisi, dolaşımdaki lökositlerin patoloji bölgesinde yoğunlaşmalarını ve endotel ile ilişkilerinin artmasını sağlamaktadır (89).

2. 3. 3. 2. 2. Rolling

Normal koşullarda dolaşımdaki lökositler, damar endoteli ile nadiren temasta bulunurlar. Endotelin, İ/R ile oluşan radikaller tarafından uyarılması sonucu lökositler ve özellikle de nötrofiller, kendi etraflarında yuvarlanmaya başlarlar. Yuvarlanma olayını, aynı gruptan üç molekül yönlendirir. Bunlar lökositlerde bulunan L-selektin, endotel hücrelerinde yer alan P ve E selektindir. L-selektin, lökositlerin çoğunda bulunmakla beraber en yoğun olarak bulunduğu grup nötrofillerdir. L selektin, aktive olmamış nötrofillerin uyarılmış endotel hücrelerindeki P ve E selektinlerle birleşip ilk rolling olayının başlamasından sorumludur. L, P ve E selektinlerin etkileşimi sonucu lökositlerde yuvarlanma olayı gerçekleşir (90).

2. 3. 3. 2. 3. Adhezyon

Serbest radikaller, nötrofil ve endotel hücrelerinden selektin moleküllerinin yanı sıra adhezyon moleküllerinin de açığa çıkmasını sağlar. CD11/CD18, lökosit integrini olarak bilinir ve nötrofiller tarafından daha çok salınan, adhezyon yönlendiren bir moleküldür. Adhezyon olayı yalnızca lökositler arasında gerçekleşen bir olay değildir. Endotel hücrelerinin de bu olayda rolü büyüktür. ICAM-1, endotel hücreleri tarafından salınır ve lökosit integrini CD11/CD18'in karşılığıdır. ICAM-1'in salınımı, İ/R patogenezinde iskemi sonrası nötrofil-endotel hücresi adhezyonunun moleküler düzeyde en önemli belirleyicisidir. CD11/CD18 ve ICAM-1'in reaksiyona girmesi, endotel hücrelerine yapışan nötrofillerden, iskemik dokuya direk radikal transferini hızlandırır. Bu geçiş, kapiller düzeyde endotel hücrelerinin arasının açılarak damarın bariyer yapısını yitirmesine, oluşan aralıklardan nötrofillerin dokuya kaçması şeklinde gerçekleşir (27).

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

Serbest oksijen radikalleri, NO'ı inhibe ederler. NO, kararsız bir nitrat bileşimidir. Damarlarda gevşemeye sebep olması, ilk tespit edilen fonksiyonu olmakla beraber organizmada birçok biyolojik olayda görev alır. Kas, deri, bağırsak ve kalp gibi birçok organ sisteminde var olduğu bilinmektedir. Endotel hücreleri, lökositler gibi pek çok hücreden salınabilir. NO, lökositin endotele adhezyonunu önleyen en önemli endojen moleküldür. Ancak NO salınımı, reperfüzyon hasarı sürecinde ortaya çıkan süperoksitin, endotel hücrelerine etkisi ile inhibe olur (91).

Adhezyondan sonra özellikle nötrofiller endotel hücrelerinin arasından diapedez ile dokuya geçerek burada birikirler ve aktif oksijen (respiratuvar patlama), proteolitik enzim ve inflamatuvar sitokinlerle doku hasarını başlatırlar (92).

2. 4. ANTIOKSİDANLAR

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde, hücre hasarına kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkmaktadır. Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipitlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar lipit peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipitlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. (93,94).

Başlıca antioksidan etki çeşitleri şunlardır:

1. Reaktif oksijen türlerinin enzimle ya da doğrudan temizlenmesi,
2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi,
3. Metal bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,
4. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi.

Antioksidanlar; enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere başlıca iki grupta sınıflandırılabilir (Tablo III), (95).

Tablo III: Antioksidanların sınıflandırılması (95)

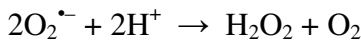
ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR	
1. Enzimatik Antioksidanlar	2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar
- Süperoksit Dismutaz (SOD)	I. Makromoleküller
- Katalaz (CAT)	- Seruloplazmin
- Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	- Transferin
- Glutasyon Redüktaz (GR)	- Ferritin
- Glutasyon-S-transferaz (GST)	- Hemogloblin
- Mitokondrial sitokrom oksidaz	- Miyogloblin
- Hidroperoksidaz	II. Mikromoleküller
	- Vitamin E
	- Vitamin C
	- Vitamin A
	- Tiyoil içerenler:
	Glutasyon
	N-asetil sistein
	Metiyonin
	Kaptopril
	- Glukoz
	- Ürik asit
	- Bilirubin
	- Albumin
	- Ubiquinon
	- Melatonin
	- Selenyum
	- Lipoik asit

EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	
- Ksantin oksidaz inhibitörleri	- Trolox-C
Allopurinol	- Endojen antioksidan aktiviteyi artıran mad.
Oksipurinol	Ebselen, Asetilsistein
Folik asit	- Non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları
- NADPH oksidaz inhibitörleri	Mannitol, DMSO
Adenozin	- Demir şelatörleri
Lokal anestetikler	Desferroksamin
Kalsiyum kanal blokörleri	Dimetiltiyöre
Non-steroid antiinflamatuvarlar	- Sitokinler
- Nötrofil adezyon inhibitörleri	TNF, İnterlökin-1
- Soya fasulyesi inhibitörleri	- Barbitüratlar
- Rekombinant human-SOD	- Flavonoidler

2. 4. 1. Enzimatik Antioksidanlar

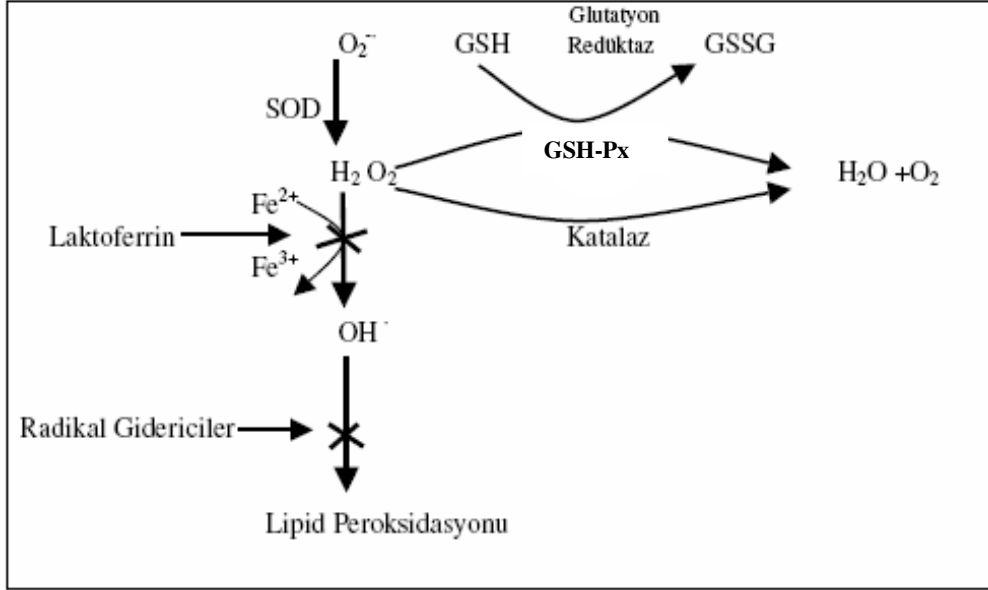
2. 4. 1. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, bir metaloenzimdir. Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur. SOD, McCord ve Fridovich (96) tarafından bulunmuştur ve süperoksidin hidrojen perokside dönüşümü reaksiyonunu katalizler.



Süperoksit dismutaz, bu reaksiyonda hem oksidan hemde redüktan olarak hareket eder. Oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı SOD, CAT ve GSH-Px enzim sistemiyle birlikte çalışan bir savunma mekanizmasıdır (Tablo IV). Böylece oluşan H_2O_2 , CAT veya GSH-Px enzimleri tarafından su ve oksijene indirgenmektedir. Peroksit radikalinin dismutasyonu ile oluşan H_2O_2 doku için biyolojik avantaj sağlar (97).

Tablo IV: Antioksidan savunma mekanizması (97)



Süperoksit dismutazın bu reaksiyonu oksidatif strese karşı ilk savunma olarak da adlandırılır. Çünkü O_2^- , zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki O_2^- düzeyleri kontrol altında tutulur. Bütün canlılardaki SOD, kofaktör olarak içerdiği metal iyonuna göre dört izoenzim halinde sınıflandırılabilir (98, 99).

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

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

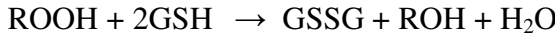
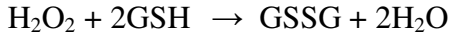
3. Fe-SOD: Bazı bakterilerde saptanmıştır.

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

İnsanlarda SOD enzimi: Sitolik Cu/Zn-SOD; mitokondrial Mn-SOD; plazma, lenf ve sinovyal sıvılarda bulunan ekstrasellüler SOD olmak üzere 3 formda bulunur (98).

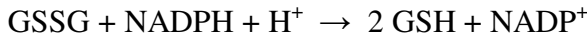
2. 4. 1. 2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz, H₂O₂ ve büyük moleküllü lipit hidroperoksidlerinin indirgenmesinden sorumludur. Sitozolde yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir (98). Sitozolde yerleşik GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizleyerek, H₂O₂ ve organik hidroperoksidlerin (ROOH) indirgenmesini sağlar:

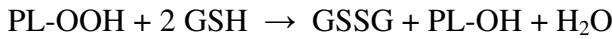


Glutasyon peroksidazın iki substratı vardır. Substratlarından biri olan peroksidler alkole indirgenirken, diğer substrat olan indirgenmiş glutasyon (GSH) yükseltgenir. Oluşan yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), GR enziminin katalizlediği bir başka reaksiyon ile tekrar GSH dönüşür:

GR



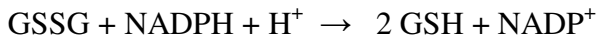
Yapısı ve fonksiyonları çok yakın zamanda aydınlatılabilmüş olan bir diğer GSH-Px, “fosfolipit-hidroperoksid glutasyon peroksidaz” enzimidir. Bu enzim de selenyum içerir. Ancak monomerik yapıdadır. Zar yapısındaki fosfolipit hidroperoksidlerini, alkollere indirgeyerek, özellikle E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı korunma sağlar (100, 101).



2. 4. 1. 3. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz, bir flavin enzimidir ve koenzimi NADPH ve prostetik grubu FAD'dır. Hem sitozol hem de mitokondride bulunmaktadır. GSSG hücreyi antioksidanlara karşı koruyamaz. Hücre, elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanan GR'ın katalizlediği bir reaksiyon ile GSH tekrar oluşturur. NADPH, H₂O₂'in indirgenmesinde indirekt olarak elektronları sağlar. Oluşan NAD⁺ ise G6PD enzimi yardımıyla NADPH'a dönüştürülür (102).

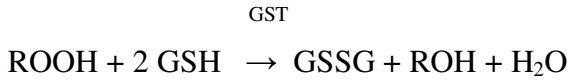
GR



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

Glutasyon-S-transferazlar, hücresel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt birimden oluşan multifonksiyonel protein ailesidir. Genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılır. GST ailesi hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta

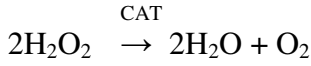
araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı GST'ler, selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler (103).



Glutasyon-S-transferazlar, glutasyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlamaktadır (104).

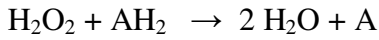
2. 4. 1. 5. Katalaz (CAT)

Katalaz 60 kDa ağırlığında 4 aynı yapıda tetrahedral subunitler içeren hem enzimdir. 240 kDa molekül ağırlığında her molekülde 4 adet ferriprotoporfirin içerir. CAT, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalayan reaksiyonu katalizler (98).

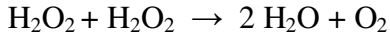


Katalaz, peroksizomlarda yerleşmiş olup kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbrekte yüksek miktarlarda bulunmaktadır.

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



Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırmaktadır (105).



2. 4. 2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

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

Yağda çözünen vitaminler içerisinde önemli yere sahip vitamin E, özellikle membran ve lipoproteinlerin bileşenleri üzerinde zincir kırıcı antioksidan etkiye sahiptir. α -tokoferol vitamin E türevleri içerisinde en aktif bileşik olup, zincir reaksiyonları ile ilişkili peroksil radikalini temizleyerek lipit peroksidasyonunu engeller (106).

Yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka bu moleküle antioksidan özellik kazandırır (107). Bununla birlikte α -tokoferol singlet oksijen, alkoksil radikali, peroksinitrit, nitrojen dioksit, ozon ve süperoksit radikalleri ile de tepkimeye girer. Lipit radikalleri ile tepkimesi sonucu oluşan α -tokoferol radikalinin, peroksil radikaline göre

membranların yağ asidi zincirlerine karşı reaktivitesi çok düşük olup, askorbik asit başta olmak üzere diğer molekül veya mekanizmalar tarafından α -tokoferola dönüştürülür (108).

Askorbik asit (vitamin C) glukoz metabolizmasından gelen, suda çözünen vitaminler grubundandır. Prolin, lizin ve dopamin alfa hidroksilaz enzimlerinin kofaktörü olup, bu amino asitlerin hidroksilasyonunda ve kollojen fibrillerin sentezinde gereklidir. Askorbik asidin bir elektron oksidasyonu sonucu monodehidro askorbil radikali oluşurken, reaksiyona girdiği radikali de etkisiz hale getirerek serbest radikallerin organizmaya verdiği zararı engeller. Askorbik asidin radikalik formu ise glutasyon sistemi tarafından askorbik aside yeniden dönüştürülür (109).

2. 4. 2. 2. Karotenoidler

Karotenoidler (β -karoten, Likopen, Zeaksantin, Lutein, Violaksantin), genelde sarı ve turuncu renkli bileşikler olup bazı bakteriler ve alglerde, çoğu zaman ise bitkilerde bulunan pigmentlerdir. İnsan ve hayvanlar karotenoid biyosentezini gerçekleştiremedikleri için bu bileşikleri diyetle alırlar. Karotenoidler organizmada, triplet uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama, singlet oksijeni baskılama ve bazı oksijen radikallerini temizleme gibi koruyucu etkilere sahiptir. Bununla birlikte karotenoidler, lipit membranlara lokalize olarak membranların oksidatif strese karşı hassasiyetini azaltır (110).

2. 4. 2. 3. Glutasyon (GSH)

Glutasyon, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptit olup antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. Organizmada temel olarak; peroksidaz aracılı peroksitlerin katabolize edilmesi, hücrel tiyol ve redoks potansiyelinin düzenlenmesi, bir nörotransmitter veya immünofarmakolojik tiyol görevi üstlenerek endokrin ve immün sistem arasındaki interaksyonu sağlaması, redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırarak strese cevabın aktivasyonu gibi görevler üstlenir (111, 112).

2. 4. 2. 4. Ürik asit (Ürat)

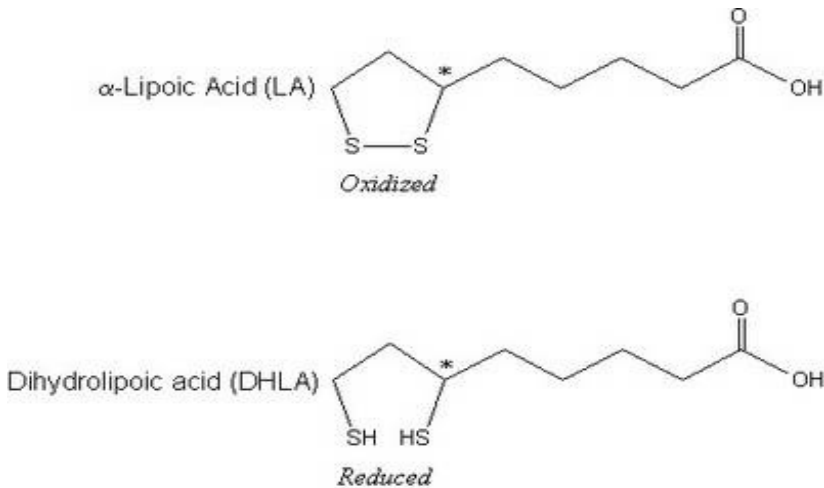
Ürik asit, XO'nun oksipürünleri (ksantin, hipoksantin gibi) oksitlemesi ile oluşur. İnsan ve gelişmiş primatlarda pürin metabolizmasının son ürünüdür. Ürat, fizyolojik koşullarda singlet oksijen, HOCl ve OH^{*} gibi reaktif bileşikler baskılar fakat süperoksit radikali ile doğrudan reaksiyona girmez, peroksit kaynaklı lipit peroksidasyonuna karşı korur, bu da ürik asidin antioksidan etkilerinin olduğunun göstergesidir (113).

2. 4. 2. 5. Melatonin

En zararlı radikallerden OH[•]'ni ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik olmasıdır. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin engelini de kolayca geçer. Bu nedenlerle çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Melatoninin çok yüksek dozlarda ve uzun süre kullanımında bile toksik etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca, bazı antioksidanlar gibi prooksidan aktivitesi de yoktur. DNA hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir. Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi azalır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde önemli olabileceği düşünülmektedir (114, 115, 116).

2. 5. ALFA LİPOİK ASİT (α -LA)

Oktonoik asidin disülfid türevi olan (6,8-dithio-octanoic acid) α -LA, aynı zamanda tiotik asit olarak da bilinen ve tam kimyasal adı 1,2 ditiyolan -3- pentonoik asit (C₈H₁₄O₂S₂) olan doğal bir bileşiktir (117, 100). α -LA fizyolojik sistemlerde bulunur, tiyol grubu içerir ve antioksidan aktivitesi önemli bir moleküldür (118). Nispeten küçük bir moleküldür (MA: 206). Yükseltgenmiş formunda intramoleküler disülfid bağı oluşturan, disülfid türevi bir oktonoik asittir. α -LA'nın okside olmuş ditiyolan halkası çevresel şartlara bağlı olarak moleküle yüksek bir indirgeme özelliği kazandırmaktadır. α -LA ve indirgenmiş hali olan DHLA'nın kimyasal reaktivitesini sağlayan da ditiyolan halkasıdır (Şekil 8). Bu yapı α -LA'yı bilinen tiyol içeren diğer biyomoleküller arasında özgün kılmaktadır (119).



Şekil 8: Dihidrolipoik ve lipoik asidin kimyasal yapısı (120).

Alfa lipoik asit insan diyetinde yeterli miktarda bulunmasına rağmen, de novo olarak mitokondride lipoik asit sentaz tarafından sentezlenmektedir. Hem lipit hem de sulu ortamda çözünür, kolayca emilir ve hücrelere taşınarak, DHLA'ya indirgenir. α -LA hücreye girdikten

sonra sitozolik enzimler olan GR, tiyoredoksin redüktaz ve mitokondrial enzim E3 tarafından indirgenmektedir. α -LA bağırsaktan emildikten sonra, çeşitli dokularda metabolik değişikliğe uğradıktan sonra salgılanır. Lipoat metabolizmasındaki katabolik süreç pentanoik asit yan zincirinin β -oksidasyonu üzerinden gerçekleşmektedir. α -LA metaboliti olan 3 ketolipoat, serbest α -LA'nın β -oksidasyonla salgılandığını göstermektedir (8).

Alfa lipoik asit sitrik asit siklusundaki multienzim dehidrogenaz kompleksinin (piruvat dehidrogenaz ve α ketoglutarat dehidrogenaz) kofaktörüdür (121).

Dihidrolipoik asit, α -LA'ya göre antioksidan etkisi daha fazladır (8).

Alfa lipoik asid'in iki ayrı izomerik formu vardır. R formu doğal, S formu ise sentetiktir (121). Redükte DHLA ve okside α -LA formlarının her ikisi de; OH^\bullet , HOCl ve $^1\text{O}_2$ 'i doğrudan temizler, H_2O_2 ise redükler. α -LA ve DHLA doğal olarak fizyolojik sistemlerde bulduklarından ideal terapötik antioksidan olduğu düşünülebilir. α -LA, antioksidan etkiye ilaveten bazı metabolik yollarda enzim aktivitelerini de etkileyebilir. Hepatik mikrozomal enzimlerden sitokrom P-450 redüktaz ile disülfit-tiyol değişimi yoluyla P-450 redüktazı inhibe edebilir. NOS ile sitokrom P-450 redüktaz homologdur. Bu yüzden α -LA tarafından inhibe edilebilir (118).

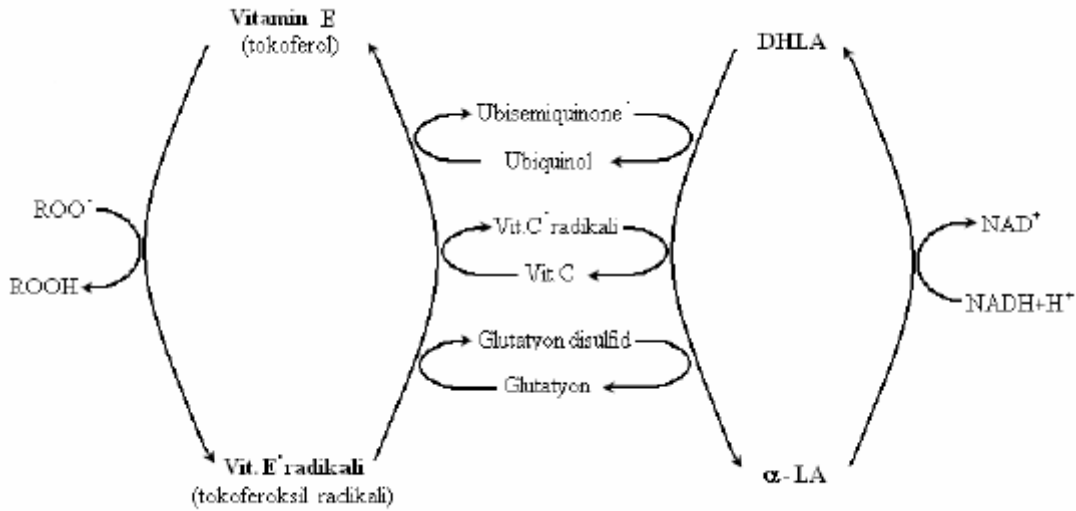
Dihidrolipoik asidin antioksidan etkisi kanıtlanmış olmasına rağmen özellikle demirin varlığında prooksidan etki gösterebilir. DHLA invitro hem ferrik hem ferröz demir ile şelat oluşturur. Bu nedenle demirin oksidatif hasarını önler. Ancak ferritinden demirin ayrılmasını ve Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye dönüşümünü azaltarak oksidatif hasarı arttırabilir (121). α -LA ve DHLA'nın antioksidan ve prooksidan olarak fonksiyon gösterme yeteneği oksidan stresin tipi ve fizyolojik şartlar tarafından belirlenmektedir. Tiyol bileşikleri tarafından oluşturulan prooksidan etkilerin çoğu O_2^\bullet , H_2O_2 ve OH^\bullet oluşmasına bağlanmaktadır (8).

Bir maddenin potansiyel bir antioksidan olarak kabul edilebilmesi için önemli olan çeşitli kriterler vardır. Bunlar;

- Radikal temizleme kapasitesi,
- Metal şelasyonu yapabilme özelliği,
- Amfifilik karakteri,
- Biyoyararlanım ve güvenliği,
- Gen ekspresyonu üzerine etkisi,
- Diğer antioksidanlar ile etkileşimi ve
- Metabolik rejenerasyon yeteneğidir (122).

Alfa lipoik asit ve bunun redükte formu DHLA tüm bu kriterleri karşıladıkları için ideal antioksidanlar olarak kabul edilebilir (123).

Lipoik asidin diğer antioksidanlar ile etkileşimi de söz konusudur. α -LA'nın en önemli özelliklerinden birisi vitamin C, GSH ve indirekt olarak vitamin E'yi yeniden oluşturma yeteneğidir. α -LA, bu suretle vitamin C ve vitamin E yetersizliği semptomlarını önleyebilmektedir. α -LA suda ve lipit tabakada çözünülebilirliği nedeniyle lipit-su ara yüzeyinde okside antioksidan redüksiyon işlevlerini yerine getirebilir. Vitamin E'nin yeniden oluştuğu siklusta vitamin C ve glutatyon ile etkileşerek membranları korur (Şekil 9), (124, 122).



Şekil 9: Lipoik asidin diğer antioksidanlarla etkileşimi (95)

Moini ve arkadaşları, α -LA ve DHLA antioksidan ve prooksidan etkilerini bir yayında derlemiştir. Buna göre çeşitli deneysel modellerin kullanıldığı birçok çalışma; α -LA takviyesinin in vivo'da çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar altında oksidatif stresi azalttığına ve diğer antioksidanların seviyesini iyileştirdiğine dair kanıtlar ortaya koymaktadır (125).

Alfa lipoik asit predominant olarak beyin, böbrek, karaciğer, ince bağırsak ve iskelet kaslarında bulunmaktadır. Memeli dokuları 5–25 nmol/g α -LA içermekle birlikte, bunun hemen hemen tümü proteine bağlı formda bulunup, dışarıdan verilmediği sürece hücrede sadece çok az serbest α -LA bulunmaktadır (126).

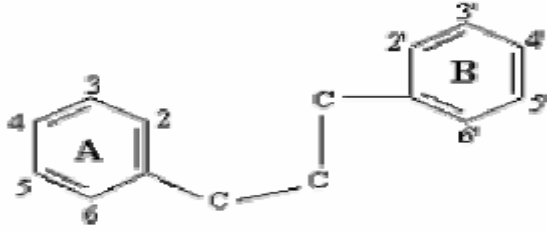
Çeşitli sebze ve meyveler ile hayvansal dokular farklı düzeylerde lipoillizin formunda R formda α -LA içerirler. Ispanak başta olmak üzere brokoli, domates, bezelye, Brüksel lahanası ve pirinç α -LA içeren bitkisel kaynaklardır. Kalp, karaciğer ve böbrek gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip hayvansal dokular da α -LA bakımından zengin kaynaklardır (125, 127).

Lipoik asit hem membranda hem de sıvı fazda fonksiyon görebilen, birçok tıbbi problemin tedavisi için büyük umut vaat eden çok önemli bir antioksidandır. Almanya'da

1966'da karaciğer sirozunun tedavisi ve ağır metal zehirlenmesinin tedavisi için uygun bulunmuştur ve günümüzde daha çok diyabetik nöropati için kullanılmaktadır. Bu güne kadar bilinen bir yan etkisi yoktur (122).

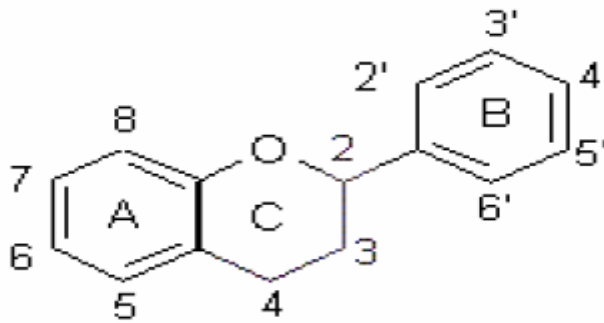
2. 6. FLAVONOİDLER

Flavonoidler, bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan yararlı biyokimyasal ve antioksidan etkileri olan bileşiklerdir. 15 C atomludurlar, 2 fenilbenzopiron (difenil propan) halka yapısı gösterirler. Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak adlandırılırlar (128, 129). İki benzen halkası lineer 3 C zinciri ile birleşir (Şekil 10), (130, 131).



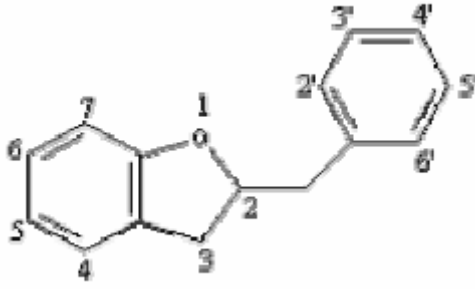
Şekil 10: Benzen halkasının birleşimi

Flavonoidler yüksek organizasyonlu bitkilerdeki en karakteristik sınıfı oluştururlar. Flavonoidlerin çoğu angiosperm ailesinde çiçek pigmentleri gibi kolaylıkla tanınabilir. Halen bu olay sadece çiçeklerle sınırlı kalmayıp bitkilerin bütün parçalarını içerir. Flavonoidlerin kimyasal yapısı kroman ile birlikte 2, 3 veya 4 pozisyonundaki 2 aromatik halka taşıyan C 15 iskeletine dayanır (Şekil 11), (130,131).



Şekil 11: Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Bazı durumlarda ise 6 üyeli heterosiklik C halkası izomerik açık formda bulunur veya 5 üyeli bir halka ile yer değiştirir (Şekil 12), (130, 131).



Şekil 12: Heterosiklik C halka yapısı

Üç C'lu zincirin santral C atomunu içeren oksijen köprüsü sınırlı sayıda türde meydana gelir. İçi FURAN tip heterosikliklerle sonuçlanır. Flavonoidlerin birçok alt grubu yerine konan C halkasının çeşitlerine bağlı olarak sınıflandırılır. Heterosiklik halkanın hem oksidasyon durumu hem de B halkasının pozisyonu sınıflamada önemlidir (130, 131).

Yapısal olarak genellikle C₆-C₃-C₆ karbon iskeleti ve A, B, C halkaları şeklindedirler. Flavonoidler moleküler yapılarına göre başlıca flavanlar, flavanonlar, flavonlar, flavonoller, antosiyoninler ve isoflavonoidler şeklinde sınıflandırılır. Yaklaşık olarak 4000'den fazla flavonoid türü belirlenmiştir (Tablo V). Flavonoidler başlıca sebzeler, meyveler, kırmızı şarap, çay, soğan baklagillerde bulunur ve çoğu çiçeklerin ve meyvelerin rengini verir (128, 129).

Tablo V: Flavonoidlerin alt sınıfları ve besinsel kaynakları (133)

Flavonoid alt grupları	Flavonoidler	Temel besin kaynakları
Flavonoller	Kaempferol, myricetin, quercetin, rutin	Soğan, kiraz, elma, brokoli, lahan, domates, böğürtlen, çay, kırmızı şarap, karabuğday
Flavonlar	Apigenin, chrysin, luteolin	Maydonoz, kekik
İsoflavonlar	Daidzein, genistein, glycitein, formononetin	Soya fasulyesi, baklagiller
Flavanoller	Catechin, gallocatechin	Elma, çay
Flavanonlar	Eriodictyol, hesperitin, naringenin	Portakal, greycfurt
Flavanonoller	Taxifolin	Limon, narenciye

Flavonoidlerle ilk kez 1930'lu yıllarda ilgilenilmeye başlanmış, 1960'lı yıllarda ise gıda koruyucu olarak kullanılmışlardır. Flavonoidlerin en önemli etkilerinden birisi serbest radikalleri

temizleme özellikleridir. Hemen her flavonoid grubunun en iyi tanımlanmış özelliği antioksidan kapasiteleridir (128, 129).

Serbest radikallerin üretim artışı bu endojen temizleyici bileşiklerin (SOD ve CAT gibi antioksidan enzimler) kullanılıp azalmasına yol açar. Flavonoidler, endojen temizleyici bileşiklere benzer etki oluşturarak endojen antioksidan savunma sistemlerini desteklerler. Flavonoidlerin direkt radikal temizleme özellikleri vardır (128, 134, 135).

2. 6. 1. Flavonoller

Flavonollerin molekül yapısında pozisyon 4'te çift bağlı-oksijen atomu vardır. Ancak flavanollere benzer şekilde pozisyon 3'te –OH grupları içerdiklerinden dolayı isminde hala "-ol" eki vardır. Fakat yapılarında çift bağlı-oksijen atomu içermeleri onların "flavones" grubuna da benzetilmelerini sağlamaktadır. Bu şekil pozisyon 3'te –OH grubu olan ve pozisyon 4'te =O olan temel bir flavonol iskeletidir. Flavanoller den farkı C halkasında 2 ve 3 nolu karbonlar arasında ikili bağın olmasıdır. Bu molekül Q olarak bilinen yaygın bir flavonoldür. Diyet ürünlerinde, birçok bitki ve gıda maddesinde en çok bulunan flavonoldür. Soğan (Basaliye allium cepaonioniqnon) özellikle Q'ce çok zengindir. Antioksidan etkileri kanıtlanmıştır (132).

2. 6. 1. 1. Quersetin (Q)

2. 6. 1. 1. 1. Genel Özellikleri

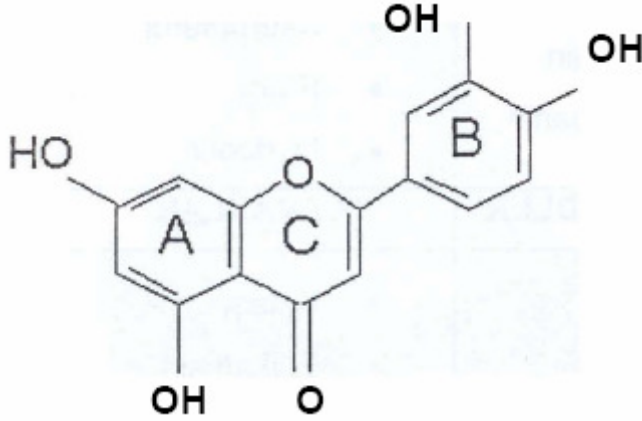
En iyi tanımlanmış flavonoidlerden biri olan Q (3,5,7,3',4' pentahidroksiflavon), insanların sık tükettiği sebze ve meyvelerde bulunan bileşiklerdir. Başlıca elma, soğan, brokoli, çilek, yeşil bezelye ve çayda bulunur. Batı diyeti 25mg/gün flavonoid içerir; Q 16 mg/gün ile bu diyetin en büyük bileşenini oluşturur (128, 134).

Flavonoidler ve Q, gıdalarda genellikle glikozit şeklinde bulunan büyük moleküllü yapılardır. Bu özelliklerinden dolayı bağırsaktan emilimleri zordur. Gastrointestinal sistemde serbest fenolik kısım ayrılır. Çünkü bunların bağırsaktan emilebilmesi için küçük molekül ağırlıklı formlara dönüşmeleri gerekir. Bağırsaklarda bulunan mikroorganizmalar, flavonoid glikozitlerinin çözülmesini gerçekleştirir. Yaklaşık %1'i bozulmadan, büyük bir kısmı ise çeşitli hidroksiaromatik asitlere dönüştürülerek böbreklerden atılır (128, 136, 137). Q'in dağılım yarı ömrünün 3.8 saat, eliminasyon yarı ömrünün 16.8 saat olduğu bildirilmiştir (134).

2. 6. 1. 1. 2. Antioksidan Özellikleri

Quersetin'in diğer flavonoidlere göre antioksidan etkinliği oldukça güçlüdür. Flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme ve antioksidan özellikleri, yapılarında bulunan üç gruptan ileri gelmektedir (Şekil 13). Bu yapısal gruplar şunlardır:

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

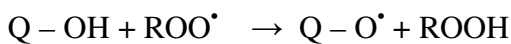


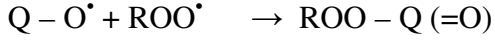
Şekil 13: Q'in yapısı ve antioksidan özellik gösteren grupları

B halkasındaki hidroksilasyon, antioksidan aktiviteye katkıda bulunur. Tüm flavonoidler 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir. Polifenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri molekül içerisindeki hidroksil grubu sayısına bağlıdır. Flavonoidlerin elektron verici özellikleri yoğun bir şekilde araştırılmış ve antioksidan özelliklerinin açıklanmasında kullanılmıştır (135, 137).

Quersetin yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir ve hücrede serbest radikalleri şu şekilde temizler:

- a) $O_2^{\bullet-}$ radikalinin temizlenmesi
- b) OH^{\bullet} radikalinin temizlenmesi: Bu etkilerini metal iyonlarının şelasyonu aracılığıyla gerçekleştirirler (128, 138, 134).
- c) NO'in, $O_2^{\bullet-}$ radikali ile etkileşmesi sonucu $ONOO^{\bullet}$ meydana gelir. Q, $O_2^{\bullet-}$ radikalini temizleyerek peroksinitrit radikalinin üretimini baskılayabilir (140,141). NO moleküllerinin flavonoidler tarafından direkt olarak temizlendikleri de bildirilmiştir (141).
- d) Lipit peroksil radikali (ROO^{\bullet}) ile reaksiyona girerek zincir kırıcı bir etki ile lipit peroksidasyonunu inhibe ederler.





Quercetin (Q-OH), lipit peroksil radikali (ROO[•]) ile reaksiyona girerek onu indirgerken kendisi daha kararlı bir radikal yapı (Q - O[•]) oluşturmaktadır (128, 134, 137).

e) Quercetin lipofilik bir antioksidandır ve lipit tabakalarının arasına yerleşerek lipit hasarını önleyici etkiye sahiptir (142, 134).

2. 6. 1. 1. 3. Quercetin'in diğer özellikleri

Flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme özelliklerine ilave olarak antiinflamatuvar, antiviral, antiallerjik, antitrombotik, antiaterosklerotik, antitümoral etkileri içeren çeşitli biyolojik özellikleri de vardır (128, 142, 134, 137). Flavonoidler XO, fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu, lökosit adhezyonun ve aktivasyonunun azaltılması, mast hücresi degranülasyonunun inhibisyonu gibi etkileriyle antiinflamatuvar özellik gösterirler (128,134). Flavonoidler ve özellikle Q, karsinojenlerin biyoaktivasyon sürecini inhibe ederek ve LDL oksidasyonunun engellenmesi yoluyla antikarsinojenik ve antiaterosklerotik etkilidirler (128,142,134,137).

Flavonoidlerin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkileri epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir ve flavonoid alımının mortalite ile ters ilişkili olduğu bulunmuştur (134). Radikal aracılı hasar sonucu oluşması muhtemel pek çok hastalıktan korunmada flavonoidlerin etkin bir rol oynayabilecekleri düşünülebilir (128,134,137).

Saf halde izole edilen flavonoidlerin oral alımının reperfüzyon esnasındaki lökosit immobilizasyonunu azalttığı rapor edilmiştir. Lökosit immobilizasyonunun flavonoidler tarafından azaltılması total serum komplemanlarının azalması ve inflamasyon benzeri durumlara karşı koruyucu mekanizmalar ile ilişkili olabilir. Bazı flavonoidler süperoksit üretimini etkilemeden nötrofil degradasyonunu inhibe edebilir. Bazı flavonoidlerin inhibitör etkisi (mast hücre degradasyonundaki inhibitör etkileri gibi) plazma membranındaki reseptör bağımlı Ca⁺² kanallarını düzenlenmesi ile olur. Q'in XO aktivitesini inhibe ettiği ve oksidatif hasarı azalttığı görülmüştür (143).

Flavonoidlerin konjugasyonu yolu intestinal hücrelerde glukuronidler ve konjugasyonu ile başlar. Daha sonra albümine bağlanarak karaciğere taşınırlar. Karaciğerde flavonoidlerin konjugasyonu sülfat grubu, metil grubu veya her ikisinin eklenmesi ile güçlenir. Bu grupların eklenmesi dolaşımdaki eliminasyon zamanını azaltır. Flavonoid iskeletinde konjugasyonu için çeşitli lokalizasyonlar vardır. Konjugasyonun tipi ve onun flavonoid iskeletindeki lokalizasyonu enzim inhibitör kapasiteyi, antioksidan aktiviteyi belirliyor olabilir. Son çalışmalar düzenli olarak flavonoid alımını çeşitli konjugatların oluşumundaki baskınlık ve belkide yüksek

aktivite ile sonuçlanacağını destekler. Bununla beraber konjugat flavonoidlerin yarı ömrü uzun olduğu için (23–28 saat) düzenli alım birikime sebep olabilir (143).

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 azdır (144). Japonya’da yürütülen bir çalışmada Q alımının artmasıyla plazma total kolesterol ve LDL-kolesterol konsantrasyonlarının azaldığı görülmüştür. Finlandiya’daki bir başka çalışmada ise Q den zengin elma ve soğan tüketimi arttığında koroner mortalite azalmış olarak bulunmuştur (146).

Siklooksijenaz ve lipooksijenaz inflamatuvar mediatörler olarak rol oynar. Bunlar genel inflamatuvar cevabı başlatan araşidonik asidin salınımına neden olurlar. Lipooksijenazı içeren nötrofiller araşidonik asitten kemotaktik bileşiklerin oluşumuna neden olurlar, aynı zamanda sitokin salınımını sağlarlar. Q hem siklooksijenazı hem de lipooksijenazı inhibe eder (antiinflamatuvar etki). Bu nedenle inflamatuvar metabolitlerin oluşumunu azaltır. Flavonoidlerin bir diğer antiinflamatuvar etkisi eikasonoid biyosentezini inhibe etmesidir (144, 131, 143).

Quersetin, kaempferol ve myricetin gibi flavonoidlerin köpekler ve maymunlarda platelet agregasyonunun etkili inhibitörleri olduğu (antitrombojenik etki) gösterilmiştir (144, 131, 143).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasalların temini Sigma Aldrich GmbH, Seelze-Almanya ve Merck KGaA, Darmstadt-Almanya firmalarından temin edilmiştir.

3. 1. 1. Diğer aletler ve cam malzemeler

Cam malzemeler	: Deneysel tüpleri, balon jojeler, beherler, v.d.
Distile su cihazı	: Elix 10 milipor, Fransa
Elektronik tartı	: Shimadzu AY120, Japonya
Elektronik tartı	: Mettler Toledo PB1501, İsviçre
Etüv	: EN 400 NÜVE, Almanya
Homojenizatör	: ART Micra D-8, Almanya
Manyetik karıştırıcı	: RCT-B İKA, Almanya
Otomatik pipetler	: Eppendorf, Research, Almanya
pH-metre	: Inolab pH level 1 WTW, Almanya
Soğutmalı santrifüj	: Eppendorf Centrifuge 5810 R, Almanya
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1601, Japonya
Spektrofotometre	: Shimadzu UV- 1201V, Japonya
Su banyosu	: BM 302 NÜVE, Türkiye
Vorteks	: Velp Scientifica, İtalya

3. 2. Deneysel Hayvanları ve Modelin Oluşturulması

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (K.S.Ü) Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak K.S.Ü. Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvar'ında yapıldı. Çalışmamızın finansmanı K.S.Ü araştırma fonundan sağlandı. Araştırma materyali olarak kullanılan 250-300 gr ağırlığında 4-5 aylık, toplam 40 adet erkek Sprague-Dawley cinsi sıçan K.S.Ü. Deneysel Araştırma Laboratuvarın'dan alındı. Sıçanlar 22-24 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlatma ve 12 saat karanlık periyodunda tutularak standart laboratuvar yemi verilerek beslendi.

Sıçanlar eşit sayıda 5 gruba ayrıldı:

Grup I- Sham grubu (n:8);

Grup II – İskemi reperfüzyon (kontrol) grubu (n:8);

Grup III - Quersetin grubu (Q) (n:8);

Grup IV- α - lipoik asit grubu (α -LA) (n:8);

Grup V - Quersetin + α - lipoik asit grubu (kombine) (n:8).

Çözelti hazırlanması;

a- Alfa lipoik asidin hazırlanması; α -LA % 0.5 NaOH içeren serum fizyolojikte çözdürülüp, HCl ile pH: 7.4'e ayarlandı (147).

b- Quersetin'in hazırlanması; Sıçan başına 30 mg/kg olacak şekilde DMSO (dimetil sülfoksit) ve steril distile su içinde çözdürülerek hazırlandı (153).

Anestezi yapılmadan iskemiden önce aşağıdaki belirtilen sürelerde etken maddeler intraperitoneal verildi. İskemi zamanı gelmeden önce intramüsküler 40 mg/kg Ketamin hidroklorid ve 6 mg/kg Xylazin'le yapılan anesteziyi takiben, yaklaşık 3 cm boyunda mediyan laparotomi ile abdomen açıldı, SMA izole edilerek kleplendi, sıçanlar 1 saat iskemiye maruz bırakıldı. Bir saat sonunda klemp kaldırıldı ve tekrar kan akımı sağlandı. Sham grubundaki sıçanlara ise mediyan laparotomi yapıp İ/R yapılmadı ve ilaç uygulanmadı batin açılıp kapandı. İ/R grubundaki ve diğer tüm etken madde uygulanan gruplardaki sıçanlara 60 dakika süren arter klempajını takiben 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Çalışmamızda mezenterik dolaşıma gelen kollateral kan akımının kesilmesine yönelik bir işlem yapılmadı. Grup IV'deki deneklere iskemiden 15 dakika önce intraperitoneal 0,5 ml salin içinde 100 mg/kg dozunda α -LA asit uygulandı (154). Grup III'deki deneklere iskemiden 60 dakika önce intraperitoneal çözülmüş 0,5 ml 30 mg/kg dozunda Q etken madde uygulandı. Mediyan laparotomi yapıp tanımlanan işlemler yapıldı. Grup V'deki deneklere etken maddeler tanımlandığı şekilde kombine yapıldı ve tanımlanan işlemler uygulandı.

Deney sonunda, sıçanlardan biyokimyasal ve histopatolojik değerlendirme amaçlı terminal ileum doku örnekleri alındı. İşlem sonunda tüm sıçanlar sakrifiye edildi. Çalışma süresince mortalite meydana gelmedi.

3. 2. 1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Doku örnekleri, biyokimyasal değerlendirme yapılanaya kadar serum fizyolojik içeren ependorflar içinde -20 °C de çalışma zamanına kadar bekletildi ve işleme başlamadan hemen önce +4 °C de erimeye bırakıldı. Eriyen doku örnekleri teker teker soğuklukları muhafaza edilerek tartıldı ve cam tüplere konuldu. Dokulara 1 gr doku 3 hacim (hacim/ağırlık) soğuk %1.15 M KCl eklendi. Dokular 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika süreyle homojenize edildi. Enzim aktivite kaybı olmaması için örnekler buz dolu küvete yerleştirildi. Daha sonra homojenizatlar 14.000 x rpm'de +4 °C 45 dakika soğuk santrifüj edilerek süpernatantları ependorf

tüplere ayrıldı. Bu ayrılan süpernatantlardan MDA ve protein düzeyleri ile XO, SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivite ölçümleri yapıldı.

3. 3. YÖNTEMLER

3. 3. 1. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Katalaz, H_2O_2 'nin yıkımını katalize eder. H_2O_2 'nin CAT tarafında yıkım hızı, H_2O_2 'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir (148).

Ayırmaçlar

1. 1 M Tris-HCl, 5 mM 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 suya 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 sulandırılır, 1ml'lik küvete 900 μ l konur ve havaya karşı 230 nm dalga boyunda okunarak absorbansı kaydedilir (OD_1). Absorbansı ölçülen fosfat tamponun içine hazırlanan 10 mM'lık peroksitten konur ve havaya karşı aynı dalga boyunda okunarak absorbansı kaydedilir (OD_2). Sonuç $OD_2-OD_1=0.071$ olduğunda, hazırlanan peroksidin konsantrasyonu tam 10 mM'dır denilir ve deneye aşağıda gösterilen prosedürde başlanır.

TabloVI: Dokuda CAT aktivite tayini için kuvars küvetlerinin hazırlanışı

	Kör (µl)	Numune (µl)
1 M Tris HCl, 5 mM Na ₂ , EDTA, 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

Oluşan tepkime 1 cm ışık yolu, kuvars küvetlerde, 37°C'de, 230 nm'de 0., 2.5., 5. dakikalardaki absorbans değerleri ölçülerek izlenir. Doğrusal artış gösteren zaman aralığındaki optik dansite (OD) değerleri kullanılarak CAT enzim aktivitesi hesaplanır.

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: 10 mM 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. 3. 2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin H₂O₂ ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve XO kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (p-iyodonitrotetrazolium viyole: INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği OD okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırarak 2 numaralı formazan

reaksiyonunu inhibe eder. Sonuçta oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır. Bu aradaki farkın belirlenmesiyle SOD aktivitesi ölçülür (149).

Ayırıklar

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

0.025 mM INT 0.00253 gr

CAPS Tamponuyla 10 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 M Fosfat tamponu (pH 7.0)

Na₂PO₄ 54.91 mg

NaH₂PO₄ 3.58 mg

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

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

Standart Eğrinin Çizimi

Lyofilize olarak hazırlanmış SOD standardı 10 ml bidistile su ile sulandırılır. Standart eğri çiziminde kullanılacak olan diğer SOD derişimleri fosfat tamponuyla Tablo VII'deki gibi hazırlanır. 2–8 °C'de saklandığında 2 hafta süreyle dayanıklıdır.

Tablo VII: SOD standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

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

S1: Kör (fosfat tamponu)

Yöntem

Süperoksit dismutaz aktivite tayini için, ince bağırsak dokularından hazırlanan süpernatant %30 ile %60 arasında % inhibisyon aralığı olacak şekilde 0.01 M fosfat tamponu ile 1: 65 oranında sulandırılır ve aktivite tayini yapılır.

Tablo VIII: 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

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra çalışma körünün ve standardın 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorpsanları (A_1) okunur. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorpsanları (A_2) tekrar okunur.

Hesaplama

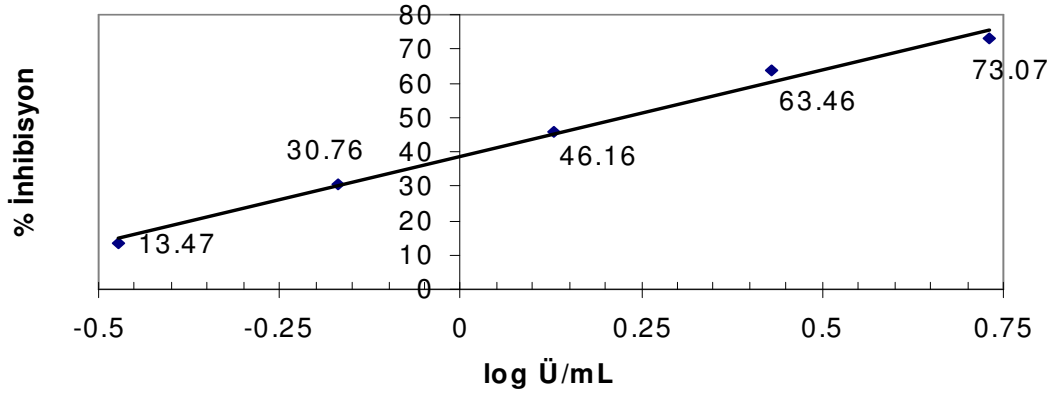
Çalışma körü SOD içermediği için inhibisyona uğramamış reaksiyon olarak kabul edilir ve değeri %100 olarak alınır. Tüm standartlar için % inhibisyon değeri bunlara ait çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplanır.

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

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

A çalışma körü

Hesaplama yapıldıktan sonra x yatay eksenine SOD derişimlerinin (Ü/ml) logaritmik dönüşüm değerleri, Y (dikey) eksenine standartlara ait % inhisyon değeri yazdırılarak standart eğri elde edilir (Şekil 14).



Şekil 14: SOD standart eğrisi

Örnek Çalışması

Tablo IX: Dokuda SOD aktivite tayini için kuvars küvetlerin hazırlanışı

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

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37°C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbans (A_1) okunur. 3 dakika sonra absorbans (A_2) tekrar okunur.

Hesaplama:

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

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

A çalışma körü

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

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

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

Aerobik şartlarda pH 3.4'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90–95°C'de inkübasyonu sonucu oluşan lipit peroksidasyonun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır; 532 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (150).

Ayırıcılar

1. SDS % 8,1'lik

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) 8.1 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

2. Asetik Asit (HAc) % 20'lik

Asetik asit 20 ml

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

3. Tiyobarbitürik asit (TBA) % 0,8'lik

Tiyobarbitürik asit 0,8 g

Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Doymuş NaOH ile pH: 3,5'e ayarlanır.

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

n-Butanol 14 ml

Piridin 1 ml

5. Stok Standart

1.1.3.3 tetramethoksiopropan (yoğunluk= 0.99 g/ml)

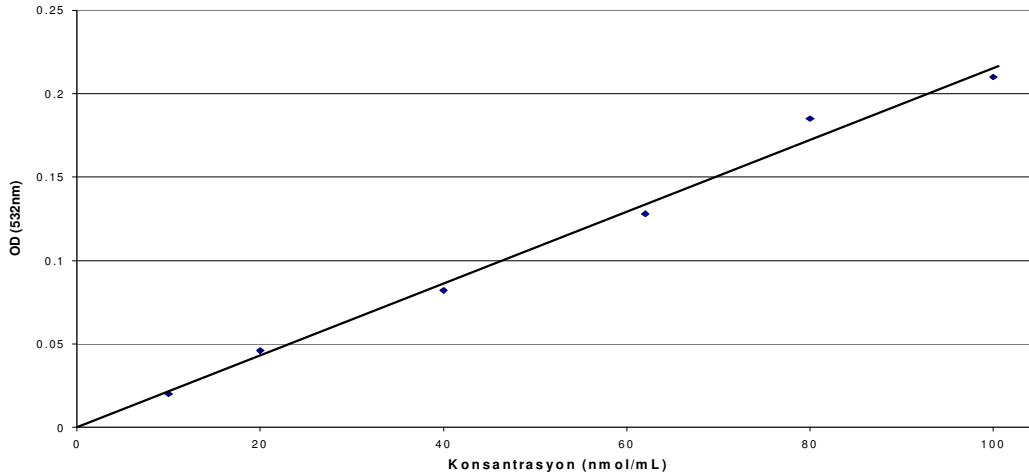
Standart Eğri Çizimi

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

Tablo X: MDA standart eğri çizimi için tüplerin hazırlanışı

Tüp No.	0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon(nmol/ml)	0	100	80	60	40	20	10
Standart (ml)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
%8.1 SDS (ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
%20 HAc (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
%0.8 TBA (ml)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf su (ml)	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
95 °C'de 30 dakika inkübe edilir, soğutulur							
Saf su (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
nBu/Pri (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Tüpler n-butanol/pridin ilavesinden sonra vortekslenir. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üsteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbanans okunur. Standart eğri grafiği çizilir (Şekil 15).



Şekil 15: Malondialdehit standart eğrisi

Yöntem

Örnek çalışması için yukarıda bahsedildiği gibi hazırlanan belirli hacimde doku örneği alınır ve MDA tayini yapılır (Tablo XI).

2. B Çözeltisi

a) B₁ Çözeltisi:

% 1 CuSO₄.5H₂O 1 g

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır.

b) B₂ Çözeltisi

% 2 Na-K tartarat 2 g

Saf suyla 100 ml'ye tamamlanır. :

3. C Çözeltisi (Günlük hazırlanır)

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

4. D Çözeltisi (Günlük hazırlanır)

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

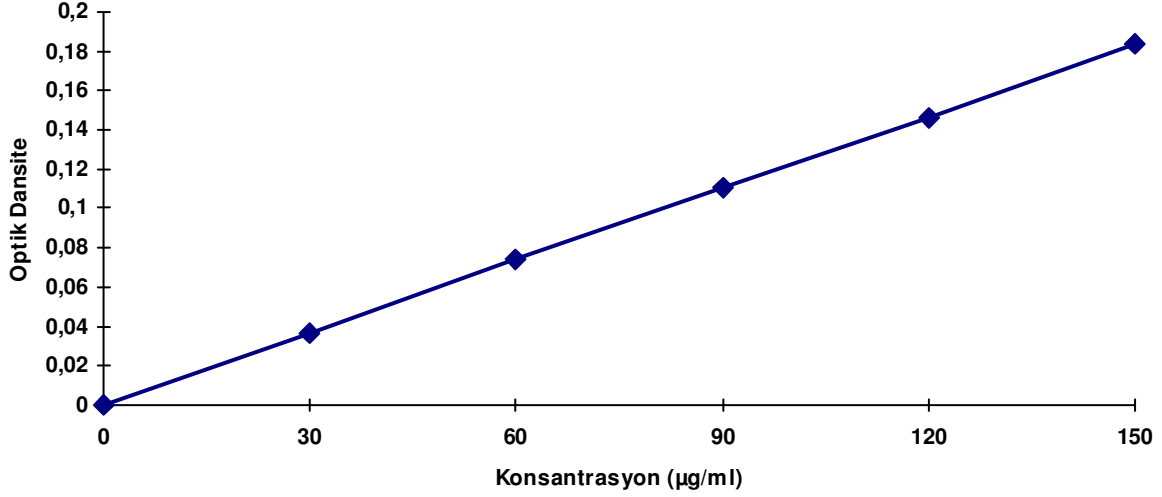
Standart Eğri Çizimi

Stok standart için 0.3 g/dl bovin albumin hazırlanır. Hazırlanan stok standarttan 5 ml alınıp 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamalandığında 150 µg'lık konsantrasyon elde edilir. Bundan seri sulandırma ile 150, 120, 90, 60, 30 µg/ml'lik konsantrasyonlar elde edilerek 750 nm'de verdikleri absorbanslar kaydedilir. Bu verilere göre konsantrasyon-absorbans eğrisi çizilir ve her numune ölçümünde standart eğri tekrarlanır (Şekil 16).

Tablo XII: 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 16: Protein standart eğrisi

Örnek Çalışması

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

Tablo XIII: Doku örneğinde protein tayini için tüplerin hazırlanışı

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

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

Hesaplama

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

3. 3. 5. Ksantin oksidaz (XO) enziminin aktivite tayini

Ksantin oksidaz aktivitesi Prajda ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (152). Bu metotta XO aktivitesi; numunede bulunduğu farzedilen XO'ın ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması esasına dayanır. Oluşan ürik asit miktarı, %100'lük TCA solüsyonunun eklenmesi ile sabitlenir. Spektrofotometrede 293 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülür. Böylece 30 dakika içerisinde üretilen ürik asit miktarı belirlenir ve aktivite U/mg protein cinsinden ifade edilir.

XO

Ksantin → ürik asit

Kullanılan reaktifler:

1. Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.5, 0.5mM Na₂EDTA'lı):
2. 4 mM xanthine: 6 mg ksantin tartılır. 10 ml'ye distile su ile tamamlanır. Günlük hazırlanır.
3. TCA (%100, w/v): 100 gr TCA tartılır, 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Deneyin yapılışı

Tablo XIV: Doku örneğinde XO tayini için tüplerin hazırlanışı

	Kör	Numune
Fosfat Tamponu (50 mM, pH 7,5, 0,5 mm Na ₂ EDTA'lı) (ml)	2.8	2.8
Ksantin (µl)	50	50
Numune (µl)	-	50

37°C'de 30 dakika inkübasyonu biten tüplere hemen;

Numune (µl)	50	-
TCA (µl)	100	100

İlave edilir ve vortekslenir.

3000–4000 x rpm de 60 dakika santrifüj sonu süpernatantlar 293 nm dalga boyunda okundu.

Sonuçlar Ü/mg protein olarak ifade edildi.

3. 3. 6. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivite tayini

Glutasyon peroksidaz aktivitesi süpernatantta Beutler yöntemiyle saptanmıştır (148). Aşağıdaki tablodaki reaktifler tarif edildiği şekilde tüplere konulur. Tüpler 37°C de 10 dakika inkübasyona bırakılır.

Kullanılan reaktifler

1. 1M Tris-HCl pH 8.0 tampon,
2. 0.1 M GSH (glutasyon),
3. 10 Ü/ml GR (glutasyon redüktaz),
4. 2mM NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)
5. 7 mM t-butil hidroperoksit

Tablo XV: Doku örneğinde GSH-Px tayini için tüplerin hazırlanışı

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

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

Hesaplama

$$\text{GSH-Px Aktivitesi (Ü/ml)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_T (1.0\text{ml})}{6.22 \times V_H (0,010 \text{ ml})}$$

ΔOD : Dakikadaki optik dansite değişimi

V_H : Örnek hacmi

V_T : Toplam hacim

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

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

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

3. 4. Histopatolojik Değerlendirme

Terminal ileumdan alınan bağırsak doku örneklerinin histopatolojik incelenmesi için, doku kesitleri % 10'luk formaldehit içinde fikse edildi. Rutin işlemlerin sonrasında 5 µm kalınlığındaki doku kesitleri Haris hematoksilin-eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Deney gruplarında oluşan hasarı belirlemede 6 aşamalı bir skorlama sistemi kullanıldı. Grade 0: Normal, Grade1: Nekrozun eşlik etmediği süperfisial mukozal hücre dökülmesi, Grade 2: Kriptlerin korunduğu mukozal villus nekrozu, Grade 3: Kriptleri de içeren mukozal villus nekrozu, Grade 4: Müskülaris tabakasının iç kısmının nekrozu veya müskülaris tabakasının incelmesine eşlik eden komplet mukozal nekroz, Grade 5: Transmural nekroz. (155)

3. 5. İstatistik

İstatistiksel analizlerin değerlendirilmesinde bilgisayar programı olarak SPSS for Windows istatistik programının Release 9.05 sürümü (SPSS Inc USA) kullanıldı. Sonuçlarımız ortalama ± standart sapma şeklinde verildi. Minimum ve maksimum değerleri belirtildi. Biyokimyasal verilerimizin değerlendirilmesinde gruplar arasındaki farkların incelenmesi için Non Parametrik Kruskal-Wallis testi, iki grup arasındaki farkın belirlenmesinde de Mann-Whitney U testi kullanıldı. Her iki test içinde p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4. 1. Biyokimyasal analiz sonuçları

1) Sham grubu ile kontrol (İ/R) grubu karşılaştırıldığında; İ/R grubunda bağırsak MDA düzeyi ve XO aktivitesi sham grubuna göre anlamlı derecede yükselmiştir ($p<0.05$). CAT ve SOD enzim aktivitesi anlamlı derecede düşmüştür ($p<0.05$). GSH-Px enzim aktivitesi de düşük olmasına rağmen istatistiksel anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$) (Tablo XVI- Şekil 17, 18, 19, 20, 21).

2) Sham grubu ile ilaç verilen İ/R gruplarının karşılaştırılmasında;

Quersetin grubu ile sham grubu arasında çalışılan biyokimyasal parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler tesbit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo XVI-Şekil 17, 18, 19, 20, 21).

α -Lipoik asit grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında; α -LA grubunun CAT aktivitesi anlamlı düşük ($p<0.05$), XO aktivitesi ise anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer enzim aktiviteleri yönünden anlamlı değişiklik oluşmamıştır ($p>0.05$) (Tablo XVI- Şekil 17, 18, 19, 20, 21).

Kombine ilaç uygulanan grupta sham grubuna göre yalnızca XO aktivitesi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer enzim aktiviteleri yönünden anlamlı değişiklik olmamıştır ($p>0.05$) (Tablo XVI- Şekil 17, 18, 19, 20, 21).

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

Quersetin grubunda MDA düzeyi, XO aktivitesi İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşük ($p<0.05$), SOD ve CAT enzim aktiviteleri ise anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur ($p<0.05$). GSH-Px enzim aktivitesi yükselmesine karşın istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0.05$) (Tablo XVI- Şekil 17, 18, 19, 20, 21).

α -Lipoik asit grubunda, MDA düzeyinde anlamlı bir düşüş saptanmıştır ($p<0.05$). SOD enzim aktivitesi ise anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$), diğer biyokimyasal parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere rastlanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo XVI- Şekil 17, 18, 19, 20, 21).

Kombine ilaç grubunda, MDA düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü saptanırken ($p<0.05$), SOD enzim aktivitesinin anlamlı derecede arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde yükselme olmasına karşın istatistiksel anlamsız olduğu gözlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo XVI- Şekil 17, 18, 19, 20, 21).

4) İlaç verilen üç grup aralarında Kruskal-Wallis testine göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak XO enzim aktivitesi dışında anlamlı değişikliklere rastlanmamıştır ($p>0.05$).

Mann-Whitney U testi ile ilaç grupları arasında ikili karşılaştırma yapıldığında α -LA grubu CAT enzim aktivitesi Q grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$). α -LA, XO aktivitesi ise Q grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Kombine ilaç uyguladığımız grupla diğer yalnız ilaç uyguladığımız gruplar arasında enzim aktiviteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere rastlanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo XVI- Şekil 17, 18, 19, 20, 21).

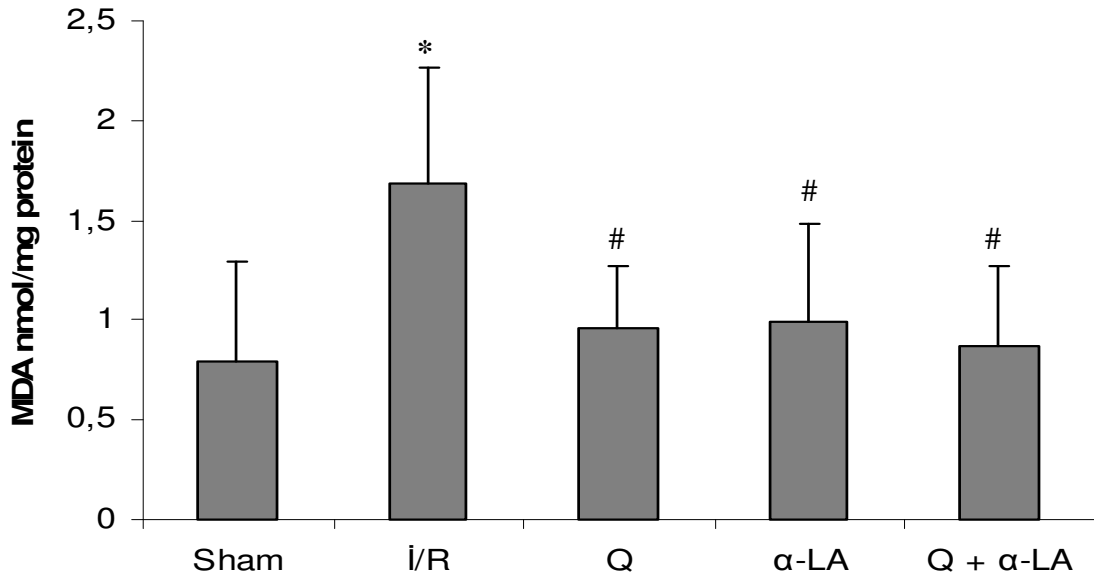
Tablo XVI: Deneş gruplarında biyokimyasal parametreler (ort \pm SS)

	MDA (nmol/mg protein)	CAT(U/mg protein)	SOD(U/mg protein)	GSH- Px(U/mg protein)	XO(U/mg protein)
Sham	0,79 \pm 0,50 (0,09-1,78)	31,56 \pm 9,35 (19,77-47,43)	37,57 \pm 16,32 (23,29-75,53)	0,012 \pm 0,006 (0,005-0,021)	0,14 \pm 0,064 (0,05-0,21)
İ/R (Kont)	1,68 \pm 0,59* (1,03-2,59)	17,02 \pm 6,11* (6,15-25,83)	18,36 \pm 5,80* (11,55-28,10)	0,007 \pm 0,004 (0,003-0,016)	0,42 \pm 0,11* (0,15-0,51)
Q grubu	0,96 \pm 0,31 [#] (0,49-1,42)	23,20 \pm 5,36 [#] (12,70-28,40)	30,43 \pm 11,22 [#] (15,01-47,73)	0,011 \pm 0,005 (0,006-0,018)	0,16 \pm 0,10 [#] (0,07-0,35)
α-LA grubu	0,99 \pm 0,49 [#] (0,36-1,70)	14,87 \pm 5,57* [♣] (8,53-23,13)	26,89 \pm 8,70 [#] (19,51-42,90)	0,008 \pm 0,002 (0,005-0,011)	0,41 \pm 0,22* [♣] (0,21-0,91)
Q + α- LA grubu	0,87 \pm 0,40 [#] (0,48-1,44)	21,34 \pm 9,6 (10,11-35,10)	29,11 \pm 8,56 [#] (21,02-46,96)	0,011 \pm 0,006 (0,003-0,022)	0,29 \pm 0,14* (0,09-0,47)

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

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

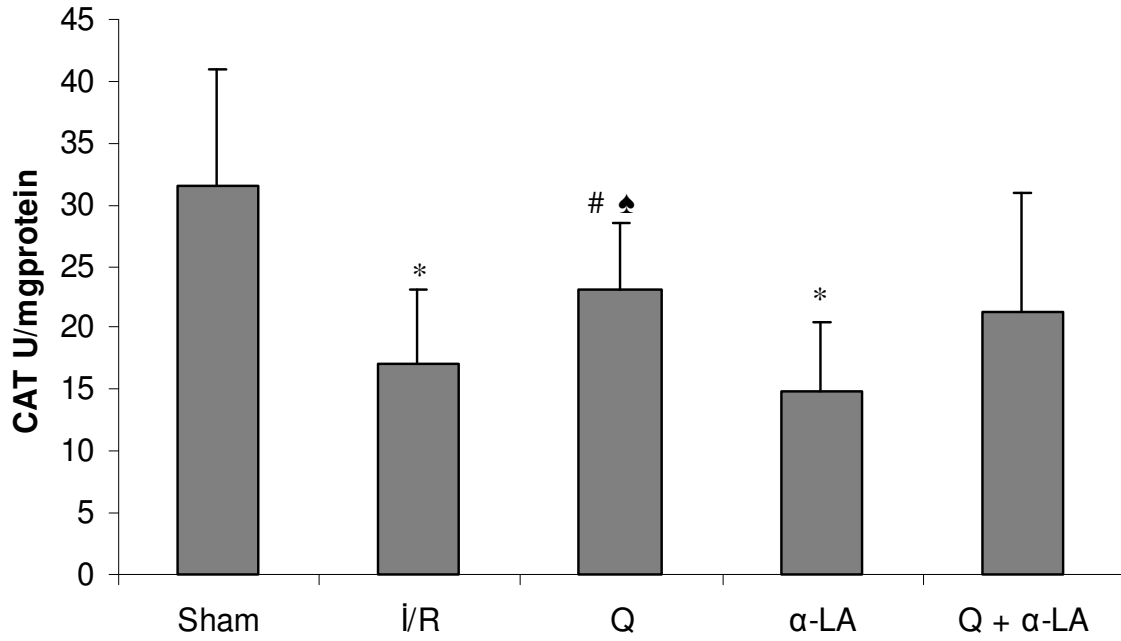
♣ : Quersetin grubuna göre anlamlı fark var ($p< 0.05$)



* : Sham grubu ile İ/R grubu arasında istatistiksel anlamlı fark var ($p < 0.05$)

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

Şekil 17: Grupların MDA düzeyleri

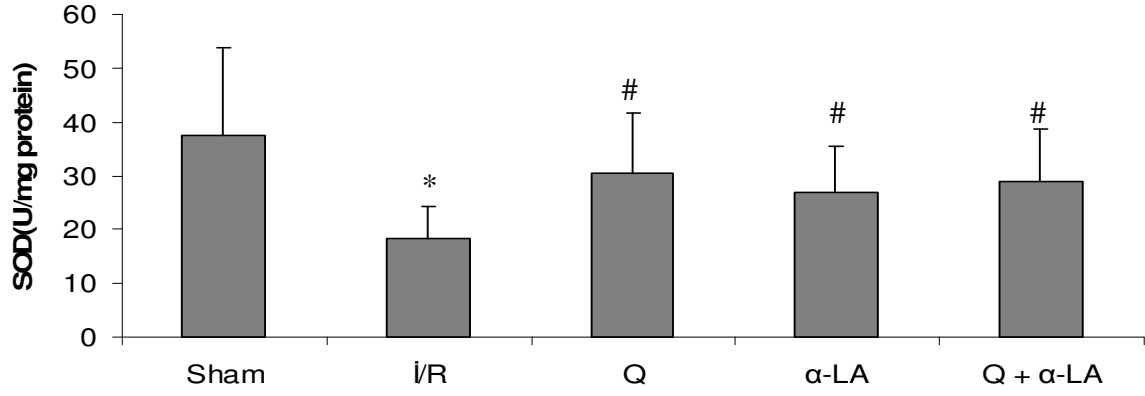


* : Sham grubuna göre istatistiksel anlamlı fark var ($p < 0.05$)

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

♠ : Quersetin grubu CAT aktivitesi α-LA göre anlamlı yüksek ($p < 0.05$)

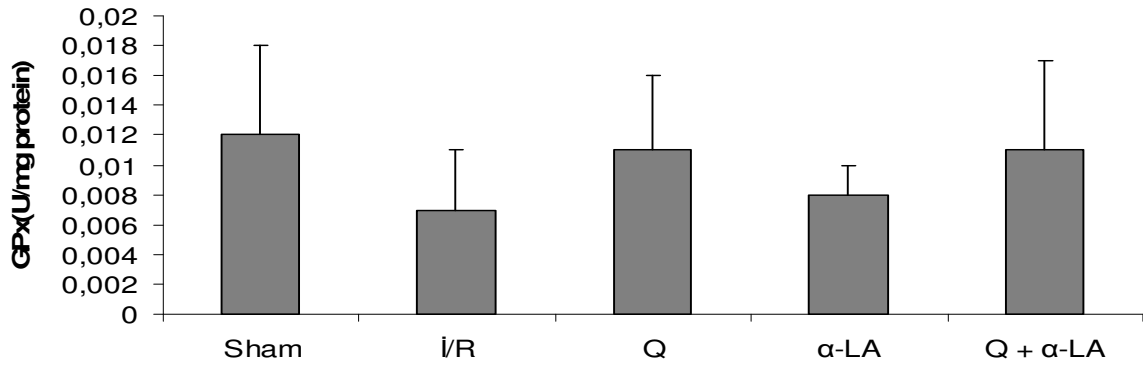
Şekil 18: Grupların CAT enzim aktivitesi



* : Sham grubu ile I/R grubu arasında istatistiksel anlamlı fark var ($p < 0.05$)

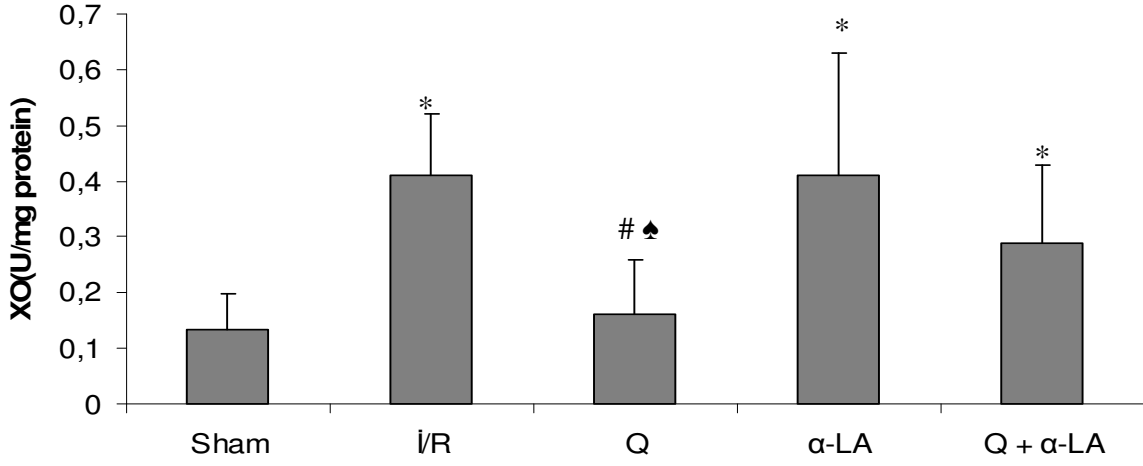
: I/R grubuna göre istatistiksel anlamlı fark var ($p < 0.05$)

Şekil 19: Grupların SOD enzim aktivitesi



Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark yok ($p > 0.05$)

Şekil 20: Grupların GSH-Px enzim aktivitesi



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

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

♠ : Quersetin grubu XO düzeyi α-LA göre anlamlı düşük ($p < 0.05$)

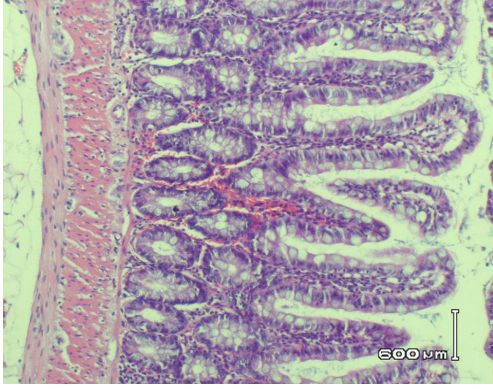
Şekil 21: Grupların XO aktivitesi

4. 2. Histopatolojik analiz sonuçları

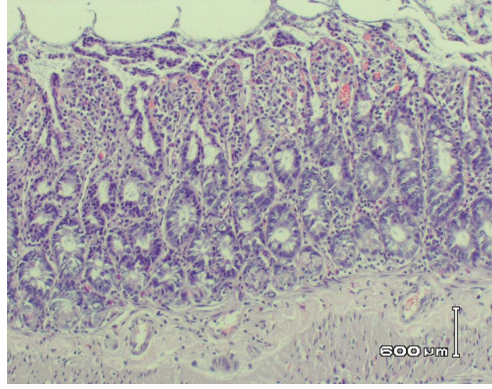
Grupların histopatolojik analizlerinde, sham grubunda hiç hasar oluşmazken kontrol grubu en fazla hasarın gözlendiği grup olmuştur. Diğer grupların kontrol grubuyla ve kendi aralarında karşılaştırmaları yapıldığında birbirleriyle aralarında istatistiksel anlamlı fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$).

Tablo XVII: Grupların histopatolojik analiz sonuçları

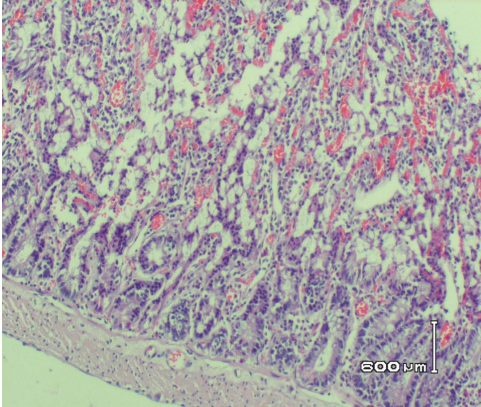
	Ort ± SS (minimum-maksimum)
Sham grubu	0,000±0,000 (0,00-0,00)
I/R (kontrol) grubu	0,875±1,1260 0,00-3,00
Q grubu	0,500±0,756 0,00-2,00
α-LA grubu	0,625±1,061 0,00-3,00
Kombine grubu	0,625±0,916 0,00-2,00



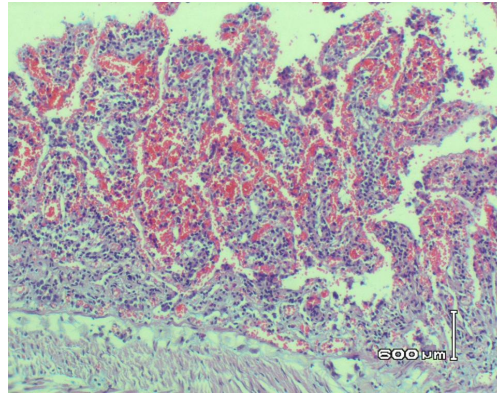
Şekil 22: Grade 0: Normal ince barsak dokusu



Şekil 23: Grade 1: Mukozal hücrelerin dökülmesi. Kript yapıları korunmuş



Şekil 24: Grade 2: Mukozal villus nekrozu. Kript yapıları korunmuş



Şekil 25: Grade 3: Kript yapılarının da bozulduğu mukozal villus nekrozu

5. TARTIŞMA

Mezenterik İ/R esnasında ince bağırsak mukozasında önemli derecede hücrel hasar meydana gelmektedir. Bu hücrel hasarın derecesi, mortalite oranıyla doğru orantı göstermektedir. İskemik ince bağırsak mukozasında patolojik değişikliklerin meydana gelmesinde rol oynayan en etkili mekanizmalardan bir tanesi serbest radikaller ile ilişkili olanıdır. Özellikle İ/R esnasındaki hasardan SOR sorumlu tutulmaktadır. İskemi olayında, solunum zincirinde, sitokrom c oksidaz reaksiyonunda O_2^{\bullet} üretimi ve ATP yıkımı artar. ATP yıkımının artmasına bağlı olarak adenzin metabolizması hızlanır, hipoksantin ve ksantin miktarı artar. XO enziminin artmasına bağlı olarak hücre içi oksijen radikali üretimi hızlanır. Anaerobik metabolizmadan dolayı hücre içi asidoz oluşur, bundan zar yapıları zarar görür. Na-K ATPaz ve diğer taşıyıcı sistemler inhibe olur. Hücreye Ca^{+2} girişi artar, hücrenin zar yapısı bozulur. Bu durum kompleman faktörlerinin aktivasyonuna ve nötrofillerin zara adhezyonuna yol açarak radikal üretimini daha da hızlandırır. Reperfüzyon olayında ise, iskemi sonrası meydana gelen hiper-oksijenasyondan dolayı özellikle solunum zincirinin son reaksiyonunda oksijenin kısmi redüksiyonu hızlanarak, oksijen radikali üretimi önemli derecede artar. Ayrıca XD enzimi XO şekline dönerek hücre içi oksijen radikali üretimini artırır. İ/R olayında anlaşılacağı üzere serbest radikal metabolizması hasardan sorumlu önemli bir faktör olarak görülmektedir. Hücre içinde oluşan serbest radikal hasarına karşı enzimatik ve non-enzimatik savunma mekanizmaları mevcuttur. A, C ve E vitaminleri ile glutasyon nonenzimatik savunma mekanizmaları arasında önemli yer tutarken, SOD, GSH-Px ve CAT enzimleri, hücre içinin enzimatik savunma mekanizmalarıdır (156).

Günümüzde gelişmiş tanı ve tedavi metodlarına rağmen, mezenter iskemisinin morbidite ve mortalitesi yüksektir. Bu nedenle önemini korumaktadır. Bu hasara yol açan mekanizmaların anlaşılması ve yeni tedavi modellerinin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. İskemik doku hasarından birçok faktör sorumlu tutulmasına rağmen, serbest oksijen türevi radikalleri (O_2^{\bullet} , OH^{\bullet}), bu hasarın esas kaynağı olarak kabul edilmektedir Hücre içinde oluşan oksijen türevi radikaller, iskeminin derecesine bağlı olarak çeşitli derecede hücrel hasara yol açmaktadır. Bu hasardan etkilenen yapılar ise hücre ve organellerin membranları, DNA ve enzimlerdir. İskemi olayında serbest radikallerin bu derecede önem kazanması, araştırmacıları değişik dokularda iskemi ve serbest radikal metabolizmasını araştıran çalışmalara yönlendirmiştir (156).

Organizmada SOR'nin zararlı etkilerini en aza indirmek amacıyla enzimatik ve non enzimatik savunma sistemleri bulunmaktadır. Normal şartlar altında SOD, GSH-Px, CAT içeren enzimatik savunma sistemleri SOR'nin oluşturduğu oksidatif hasarı önlerler. Serbest radikal oluşum hızı bu radikalleri etkisizleştirme hızı ile aynı olduğu sürece oluşan radikallerden,

organizma etkilenmemektedir. Buna karşılık antioksidan savunma azalır ya da zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulmakta ve SOR'lerine bağlı zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır. Antioksidan ajanlar birlikte kullanıldıkları zaman birbirlerinin etkilerini artırarak daha güçlü bir koruma sağlayabilir, ortaya çıkabilecek yan etkilerde de azalma meydana getirebilirler (157).

İnce bağırsak iskemisi, bağırsağı besleyen mezenterik dolaşımında yetersizlik sonucu ortaya çıkan hipoksi ve tam olarak aydınlatılamamış mekanizmasıyla bağırsak haricindeki hayati organlarda da hasar oluşturmasıyla ciddi problemlere neden olan bir hastalıktır. Tanı ve cerrahideki tüm ilerlemelere, preoperatif ve postoperatif bakımdaki tüm gelişmelere rağmen son 30 yılda %70 civarında olan mortalite oranı korunmaktadır. Gastrointestinal sistemin iskemi ve reperfüzyonunun, MOF oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir (158).

Biyokimyasal seviyedeki birçok çalışma ve hayvan deneyleri, yeniden oksijenasyonun zararlı oksijen radikallerinin fazla miktarda üretilmesine yol açtığını, bunun da doğal antioksidan savunma mekanizmasını tahrip ettiğini ve başta reperfüze olan organ olmak üzere tüm vücutta oksidatif yükü artırdığını göstermiştir (159).

İskemi reperfüzyon hasarının önlenmesi için pek çok çalışma yapılmıştır. SOR üretiminin XO inhibisyonu yapan allopurinol ile önlenmesi, radikallerin ortamdan temizlenmesi için vitamin E ve C, SOD enzimi, resveratrol, karvedilol, Q ve koenzim Q kullanılması ile İ/R hasarı azaltılabilmektedir (160).

Sıçanlarda İntestinal İ/R modeli ve bu model sonucu ortaya çıkan hasarın değişik birçok ajanla önlenmesi amacıyla, in vivo olarak birtakım deneysel çalışmalar uygulanmıştır. Bu modellerde, mezenterde iskemi yapmak amacı ile SMA'nın transeksiyonu ve oklüzyonu yapılmıştır. Bununla birlikte, uygulanan iskemi ve reperfüzyon süreleri noktasında, çalışmalar arasında farklılıklar bulunmaktadır. Ceran ve ark. (161) sıçanların bağırsaklarında 45 dakika iskemi ve bir saat reperfüzyon uyguladıkları çalışmalarında bilirubini işlemde iki saat önce vermişler ve deney sonunda bilirubin İ/R hasarını önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Juel ve ark. (162) iskemi sonrası bir saatlik reperfüzyonun ince bağırsakta mukozal hasarlanma için yeterli olduğunu belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızda bu verilerden yola çıkarak intestinal İRH oluşumunun biyokimyasal ve histopatolojik olarak tespit edilmesi üzerine bir saat iskemi ve bir saatlik reperfüzyon yapmayı planladık ve deneysel modelimizi bu çerçevede kurguladık. Çalışmamızda, mezenterik İ/R esnasında ortaya çıkan serbest radikallerden hücreyi korumada rol aldığı bilinen bazı enzimlerin aktiviteleri, serbest radikallerin oluşumunu artıran XO enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA miktarını tayin ettik. Ayrıca bu metabolizmalar üzerinde Q ve α -LA etkisini biyokimyasal ve histopatolojik yönden araştırdık.

Serbest oksijen radikallerinin direkt ölçümü, bu maddelerin stabil olmamaları ve kısa olan yarı ömürleri nedeniyle mümkün olmamaktadır. Lipoperoksidasyonun sabit bir son ürünü olan MDA, hücre membranındaki lipidler üzerindeki serbest radikal etkisinin ölçülebilir kimyasal bir belirteçdir. Komplet ve inkomplet iskemi uygulanan deneysel modellerde yapılan bazı çalışmalarda, MDA'nın hücre duvarı ayrışmasının göstergesi olduğu ortaya konmuştur. Bu sebeple, MDA düzeylerinin ölçümü, İ/R olgularında serbest radikal aktivitesini tespit etmek için kullanılmaktadır. SOR aracılığı ile vücutta oluşan oksidan hasara karşı dokular, SOD, CAT ve GSH-Px gibi birtakım radikal temizleyici enzimler taşırlar. Bu enzimler, H₂O₂ ve süperoksitleri temizler veya inaktive ederler. SOD, süperoksit radikallerini H₂O₂'e katalizler. H₂O₂ ise, CAT ve GSH-Px tarafından moleküler oksijen ve suya indirgenir. GSH-Px, glutatyon redüktaz aracılığı ile oluşan redükte glutatyonu okside forma dönüştürür. GSH-Px, düşük H₂O₂ konsantrasyonunda daha etkindir. Bu bilgilerin ışığında, bu enzimlerin konsantrasyonlarının ölçümü, iskemi sonrasında oluşan SOR hakkında indirekt olarak bilgi verirler (163). Biz de çalışmamızda oksidan hasarın derecesini belirlemek ve kullandığımız maddelerin bu hasarı önlemedeki başarısını saptamak amacıyla denek gruplarında oksidatif stres göstergesi MDA düzeyi, SOR'nin salınımını artıran XO aktivitesi ve oksidatif strese karşı savunma cevabını gösteren SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerini çalıştık.

Bu anlamda ortaya konulan tedavilerin her biri spesifik olayları inhibe ettiği için, aynı tedavide farklı hedeflere yönelerek birden fazla basamağı etkileyen tedavi stratejisine gereksinim vardır. Flavonoidler XO, fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu, lökosit adhezyonun ve aktivasyonunun azaltılması, mast hücresi degranülasyonunun inhibisyonu gibi etkileriyle antiinflamatuvar özellikte gösterirler (128,134). Bir flavonoid olan Q'nin hücrede biyolojik etkileri iyi araştırılmıştır ve İ/R hasarının pek çok basamağında etkisi olması muhtemeldir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin etkisi sonucu membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olup bir radikalın yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından bir H⁺ uzaklaştırılması ile başlar. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü MDA'dır. Lipid peroksidasyonunun başlamasında asıl etkili olan radikalın OH[•] radikali olduğu kabul edilmektedir. Q serbest radikale bağlı hasardan korunmayı farklı yollarla yapmaktadır. Bu yollardan biri direkt radikal temizleme özelliğidir. Quersetinin OH[•] radikalini ve onun öncüsü olan O₂^{•-} radikalini temizlemesinin yanında önemli bir özelliği de, lipid peroksil radikalini parçalayarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Radikallerin flavonoidler ile oksidize edilmeleri onları daha kararlı hale getirir ve reaktivitelerini düşürmektedir. Q ayrıca Fe ve Cu gibi geçiş metallerini şelatlayarak bu iyonların Fenton reaksiyonu yolu ile H₂O₂'den OH[•] radikali oluşumunu engelleyerek lipid

peroksidasyonunu önlemektedir. Flavonoidlerin lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve MDA düzeylerini anlamlı olarak düşürdükleri gösterilmiştir (160).

Yapılan literatür taramalarında İnce bağırsak İ/R hasarının önlenmesinde Q etkisini inceleyen herhangi bir çalışma olmamasına rağmen yöntem ve uygulama olarak Q'le ilgili başka organlarda yapılmış İ/R hasarı çalışmaları bulunmaktadır.

İnal M. ve ark. yaptıkları bir çalışmada sıçan böbreğine 30 dakika iskemi ve 45 dakika reperfüzyon yapmışlardır. İ/R yaptıkları grubun böbrek dokusunda MDA düzeyi ve XO aktivitesinin yükseldiğini rapor etmişler, SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin ise azaldığını göstermişlerdir. Q verdikleri ilaç grubunda ise bu parametrelerin İ/R hasarı yapılmış ilaçsız gruba göre MDA düzeyi ve XO aktivitesinin azaldığını SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttığını kaydetmişlerdir. Böylece Q'nin böbrek İ/R hasarını da iyileştirici etkisinin olduğu kanısına varmışlardır (164).

Yine, Kahraman A. ve ark. tedavi verilen grubun İ/R grubuna göre MDA'yı anlamlı düşürdüğu SOD ve CAT enzim aktivitesini anlamlı yükselttiğini göstermişlerdir (11).

Singh D ve ark. alışmalarında 2 mg/kg ve 30 mg/kg Q'i periton içine ayrı ayrı gruplarda vermişler ve MDA düzeyinin her iki grupta da kontrol grubuna göre düştüğünü diğer enzim aktivitelerinin ise arttığını rapor etmişlerdir. 100 mg/kg oral olarak verilen Q tedavide etkili olmadığını belirtmişlerdir (165).

Polat C ve ark. karaciğer de 45 dakika iskemi 1 saat reperfüzyon yapmışlar ve böbrek dokusundaki stres parametrelerini ölçmüşler. Böbrek dokusu hasarının azaldığını oksidatif stresin MDA ve diğer enzimlerin modülasyonu yoluyla önlenbildiğini rapor etmişlerdir. Histopatolojik olarak böbrek dokusunda anlamlı patolojiye rastlamamışlardır. Karaciğere uygulanan İ/R'nun böbrek dokusunda oksidatif hasara neden olabileceği bu hasarı Q ve desferroksamin vererek önleyebilecekleri kanısına varmışlardır (166).

Yine Tokyol C ve ark. sıçanlarda karaciğer iskemi reperfüzyonu modeline Q ve desferroksaminle yaptıkları çalışmada ilaçların ayrı olarak ve birlikte verildiğinde karaciğer İ/R grubuna göre ilaç gruplarının lipid yıkımını azalttığını histopatolojik olarak iyileşme sağladığını göstermişlerdir (167).

Çalışmamızda İ/R grubunda sham grubuna göre oksidatif stres parametrelerinde artış, antioksidan ajanlarda anlamlı düşüş oluşmuştur ($p<0.05$).

İskemiden önce Q uygulanan grupta (İ/R+Q) İnce bağırsak dokusunda MDA düzeyleri, kontrol grubuna (İ/R) göre anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$). Daha önceki çalışmalarla da uyumlu olarak Q verilmesi lipid yıkımını engelleyebileceği kanısına varılmıştır.

Süperoksit radikallerinin yıkımını hızlandıran SOD, CAT enzim aktiviteleri ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($P<0.05$). Bu artış Q'in XO enzimi üzerindeki inhibe edici etkisine bağlı olarak oksijen radikalleri daha az oluşmuş ve böylece antioksidan enzimlerin tüketilmesi azalmış olmasına bağlanabilir.

Süperoksit radikallerinin oluşumunu hızlandıran XO aktivitesi ise anlamlı düşmüştür ($P<0.05$). Q'in ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ettiği ve oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (143).

Nagao A ve ark. yaptıkları çalışmada bazı flavonoidlerin ki Q'de bunların içinde XO enzimi üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğunu göstermişlerdir (168). Sanhueza J ve ark. yaptıkları çalışmada XD'in XO'a dönüşümünü Q ve silibinin azalttığını bulmuşlardır (169). Bizim çalışmamızda XO aktivitesinin İ/R grubuna göre Q grubunda azalması, Q'nin XO üzerindeki inhibe edici etkisi ve XD'in XO'a dönüşümünü engellenmesine bağlanabilir.

Glutasyon peroksidaz aktivitesi artmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Sham grubu ile Q verilen grup arasında MDA düzeyi ve diğer enzim aktiviteleri yönünden anlamlı fark oluşmamıştır ($p>0.05$). Bu sonuç Q'in ince bağırsak hücresi membranlarını lipid peroksidasyonundan belli oranda koruduğunu göstermektedir. Bulgularımız daha önce bahsettiğimiz başka dokulardaki yapılmış çalışma sonuçları ile uyum göstermektedir.

İskemi reperfüzyon grubunda SOD aktivitesinin azalması serbest radikallerle ilişkili olabilir. Çünkü proteinler serbest radikallerden etkilenirler ve bu etkilenmenin derecesi aminoasit içeriklerine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle etkileşimleri yüksek olduğundan histidin, metionin gibi aminoasitlere sahip proteinler radikallerden kolaylıkla etkilenirler (160). SOD enziminin katalitik bölgesinde histidin aminoasidi vardır. Kahraman ve arkadaşları, UV radyasyonla indüklenen oksidatif hasarda (138) ve böbrek dokusu İ/R hasarında (11) Q'in $O_2^{\cdot-}$ radikallerini yakalayarak SOD aktivitesindeki azalmayı önleyebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da antioksidan Q ile SOD düzeylerini yüksek bulduk. Bu bulgu literatürle uyumlu olup hem SOD enzimini radikal kaynaklı hasardan koruması hem de enzimin tüketilmesinin önlenmesi nedeniyle olabilir.

Quersetin grubu α -LA grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark CAT enziminin aktivitesinin Q grubunda anlamlı yüksek olması, XO enzim aktivitesinin ise anlamlı düşük olması idi ($p<0.05$). Diğer parametreler arasında ise anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$).

Kombine grupla Q grubu karşılaştırıldığında çalıştığımız parametrelerimiz açısından istatistiksel anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). Bu bulgulara göre Q'in İntestinal İ/R hasarı üzerine koruyucu etkisinin olduğu, antioksidan ve oksidan parametrelere etkisi yönünden α -LA ile

kıyaslandığında daha etkili olabileceği kanısına varılmıştır. Kombine tedavinin yalnız başına uygulanan Q tedavisine ise herhangi bir üstünlüğü olmadığı düşünülmektedir.

Alfa lipoik asit ekzojen uygulandığında serbest radikal temizleme, metal şelasyonu yapma ve glutatyon gibi endojen antioksidanların rejenerasyonunu arttırma gibi antioksidan özellikler gösterir. α -LA'nın reaktif oksijen bileşiklerinden OH^\bullet , HOCl ve $^1\text{O}_2$ 'i doğrudan temizlediği, H_2O_2 ' i ise indirgediği bildirilmektedir (170).

Alfa lipoik asitin aktif şekli olan DHLA'nın antioksidan etkisi kanıtlanmış olmasına rağmen özellikle demirin varlığında prooksidan etki gösterebilir. DHLA invitro hem ferrik hem ferröz demir ile şelat oluşturur. Bu nedenle demirin oksidatif hasarını önler. Ancak ferritinden demirin ayrılmasını ve Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye dönüşümünü azaltarak oksidatif hasarı arttırabilir (128). Q'le kıyaslandığında oksidatif ajanların oluşumuna neden olan XO aktivitesini anlamlı azaltmaması, CAT enziminde artışın anlamlı olmaması ve GSH-Px enzim aktivitesinin anlamlı değişmemesi bu prooksidatif etkisi sebebiyle olabilir.

Yapılan pek çok in vivo ve in vitro çalışmada α -LA'nın lipid peroksidasyon düzeylerini azalttığı ortaya konulmuştur. Birbirine paralel olarak yapılan iki ayrı çalışmada α -LA'nın, adriamisin ile sıçanlarda oluşturulan nefrotoksisite ve kardiotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği ve artmış lipid peroksidasyonunu önemli düzeyde azalttığı belirtilmiştir (171). Arivazhagan ve ark. tarafından yapılan üç ayrı deneysel sıçan çalışmasında ise yaşlanma ile artan lipid peroksidasyon düzeyleri farklı organlarda değerlendirilmiş; lipoik asidin plazma, karaciğer, böbrek ve farklı beyin bölgelerinde MDA düzeylerini azalttığı, lipid peroksidasyon ve protein oksidasyonunu önlediği ortaya konulmuştur (147). Moini ve ark. α -LA ve DHLA'nın antioksidan ve prooksidan etkilerini bir yayında derlemişlerdir. Buna göre çeşitli deneysel modellerin kullanıldığı birçok çalışma; α -LA takviyesinin in vivo'da çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar altında oksidatif stresi azalttığına ve diğer antioksidanların seviyesini iyileştirdiğine dair kanıtlar ortaya koymaktadır (132).

Alfa lipoik asit ve ince bağırsak İ/R hasarı üzerine konuyla ilgili çalışmalara baktığımızda yalnız ebselen ile birlikte α -LA'nın uygulandığı bir çalışmaya rastladık. Güven A ve ark. yaptığı çalışmada sıçan ince bağırsak İ/R hasarının ebselen ve α -LA tarafından önlenmesi araştırılmış. Oksidan ve antioksidan ajanlar ölçülmüş ve bağırsak dokusu histolojik değerlendirilmesi yapılmıştır. İ/R grubuna göre tedavi verilen gruplarda MDA seviyesinin azaldığı SOD ve GSH-Px aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir. Histopatolojik olarak tedavi gruplarında İ/R grubuna göre bir miktar düzelme bulunmuştur (176). Çalışmamızda MDA düzeyinin İ/R grubuna göre düşmüş olması SOD aktivitesinin artmış olması daha önceki çalışmalarla uyum göstermektedir.

. Coşar E ve ark. deneysel ovaryan iskemi reperfüzyon hasarına α -LA'in koruyucu etkisi araştırdıkları çalışmalarında; α -LA uygulanan grupta İ/R oluşturulan guruba göre MDA, NO düzeylerinde ve XO aktivitesinde düşme SOD aktivitesinde ise artma olduğunu bulmuşlardır (172). Sonuç olarak α -LA ovaryan İ/R hasarında yararlı etkilerinin olacağını rapor etmişlerdir.

Dulundu E ve ark. karaciğer iskemi reperfüzyonu öncesi verilen α -LA'in bu hasarı önlemedeki etkilerini araştırmışlar ve α -LA in lipit yıkım ürünü olan MDA'yı İ/R grubuna göre anlamlı azalttığını bulmuşlardır (173). Çalışma sonucunda α -LA iyileştirici bir etkisi olduğunu rapor etmişlerdir.

Bizim çalışmamız dışında İnce bağırsak İ/R hasarına α -LA'nın etkisini araştıran bir çalışma daha bulunmaktadır (176). Çalışmamızda İ/R yani kontrol grubu ile α -LA grubu karşılaştırıldığında ilaç verilen grubun MDA seviyesini anlamlı olarak düşürdüğü bulunmuştur ($P<0.05$). Bu sonuç daha önceki çalışmalarla uyumludur. SOD enzim aktivitesini ise anlamlı olarak yükseltmiştir ($P<0.05$). Diğer parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($P>0.05$). CAT enziminin aktivitesini kontrol grubuna göre etkilememesi XO üzerinde baskılayıcı etkisinin Q gibi olmamasından dolayı SOR radikallerinin fazla üretimi ve bu üretim sonucunda SOD enzimi tarafından oksijen radikalının H_2O_2 'ye dönüşmesi, CAT enzimininde bu H_2O_2 yıkımını sağlamak için tüketilmesine bağlayabiliriz.

Bu bilgiler ışığında α -LA oksidatif stres parametrelerine etkisi daha önceki çalışmalarla uyumlu bulundu ve intestinal İ/R hasarı üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu kanısına vardık. α -LA kombine ilaç grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı her hangi bir fark yoktu ($P>0.05$).

İnce bağırsak İ/R hasarına α -LA + Q birlikte verilmesi ve etkileri ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlamadık. Çalışmamızda kombine ilaç grubunda, MDA düzeyinin İ/R grubuna göre anlamlı olarak düştüğü saptanırken ($p<0.05$), SOD enzim aktivitesinin anlamlı derecede arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinde yükselme olmasına karşın istatistiksel anlamsız olduğu gözlenmiştir ($p>0.05$). XO enzim aktivitesi ise azalmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değişiklik göstermemiştir ($p>0.05$).

Çalışmamızda kombine gurubun tedavi edici özelliğinin ayrı ayrı ilaç verilen guruplara göre daha etkili olmamasının iki ilacın birbirinin etkisini kısmen baskılamış olmasından kaynaklanacağını düşünmekteyiz.

Süperior Mezenterik Arter akımının %75 oranında 12 saat kesilmesi, ışık mikroskopuyla tanımlanabilen hiçbir histopatolojik değişikliğe yol açmamaktadır (174). Çalışmamızda, İ/R uygulanan kontrol grubunda, 8 sıçandan 4'ünde histopatolojik hasar tespit edilmedi. Bununla beraber, bu grup içerisinde en yüksek Grade 3 hasar meydana geldi. Bizim çalışmamızda,

kollateral bağırsak akımının kesilmesine yönelik bir işlem yapılmadığı için mezenterik akım retrograd olarak bir miktar da olsa devam etmiştir.

Lökositler, iskemi reperfüzyon alanına saatler içinde dahil olmaktadır (175). Bizim yaptığımız çalışmada reperfüzyon süresinin 60 dakika olması nedeni ile lökosit aracılıklı reperfüzyon hasarının oluşması başlamamış olabilir. Histopatolojik değişikliklerin izlenmemesini de buna bağlayabiliriz.

Buna rağmen histopatolojik hasarlanmaya karşı ilaçların koruyucu etkisinin olup olmadığının tam olarak ortaya çıkarılabilmesi için lökosit düzeylerinin ölçülmesi ile lökosit aracılı reperfüzyon hasarının oluşup oluşmadığının tespit edildiği ve ışık mikroskopunda histopatolojik değişikliklerin ortaya çıktığı daha uzun süreli araştırmalara ihtiyaç vardır.

Tüm bu bulguları karşılaştırdığımız da Q, α -LA ve kombine tedavilerinin ince bağırsak İ/R hasarını azaltıcı yönde etkilerinin olabileceği saptanmıştır. Bu hasarı azaltıcı etkinin, Q'de daha güçlü olması oksidan ve antioksidan ajanlar üzerindeki etkisinin daha fazla olmasından kaynaklanabilir.

Bütün bunlardan dolayı Q bize intestinal İ/R hasarını azaltıcı önemli bir ajan olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda güçlü antioksidan α -LA ve kombine ilaç grupları da intestinal İ/R hasarını azaltıcı etki göstermiştir. Kombine ilaç tedavisinin etkisi diğer tedavilere göre daha üstün bulunmamıştır. Ancak geniş kapsamlı klinik araştırmalara ve bu maddelerin antioksidan etki mekanizmalarını gösterecek daha ayrıntılı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkilerini de daha ayrıntılı görebilmek için daha ileri düzeyde çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

1- İ/R (Kontrol) grubunda, sham grubuna kıyasla oksidatif stres göstergesi olan MDA ve SOR'nin salınımında rol alan XO aktivitesi anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.05$). Oksidatif hasarı ortadan kaldırmaya çalışan antioksidan enzimlerden SOD ve CAT anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Histopatolojik tabloda ise sham grubunda hasara rastlanmamıştır. Kontrol grubunda istatistiksel olarak shama göre histopatolojik tablo anlamlı olmamasına rağmen hasar bulunmuştur ($p>0.05$). Bu durum, uyguladığımız modelin intestinal İ/R hasarı oluşturmak için yeterli olduğunu göstermektedir.

2- İntestinal iskemi reperfüzyon sonrası oluşan oksidatif hasarı önlemede, Q'nin etkili olduğunu tespit ettik. Q MDA düzeyini anlamlı olarak düşürmüştür ($p<0.05$). SOR salınımını sağlayan XO enziminin aktivitesini de anlamlı azaltmıştır ($p<0.05$). Antioksidan enzimlerde anlamlı yükselme sağlamıştır ($p<0.05$). α -LA ile kombine uygulandığında bu etkilerinde artış olmamıştır.

3- İntestinal iskemi reperfüzyon sonrası oluşan oksidatif hasarı önlemede α -LA tek başına kullanıldığında, MDA da anlamlı düşüş sağlamıştır ($p<0.05$). SOD enzim aktivitesini anlamlı artırmıştır ($p<0.05$). Bu sebeple antioksidan etki göstermiştir, Q ile kombine uygulandığında bu etkilerinde artış olmamıştır.

4- Kombine ilaç uygulamasının oksidan hasarı önlemede etkinliği var iken fakat ayrı ayrı ilaçla tedavi edilen gruplara göre bir üstünlüğü olmadığı görülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Dixon MF. The small intestine. In: Whitehead R. (Eds). **Gastrointestinal and Oesophageal Pathology**. Livingstone, Churchill. 1995; 665–77.
2. Savaş Ç, Aras T, Çakmak M, et. al. Pentoxphiline inhibits overflow and reduces intestinal perfusion. **J Pediatrics** 1997; 132: 905–910.
3. Groggaard B, Parks DA, Granger DN, et. al. Effects of ischemia and oxygen radicals on mucosal albumin clearance in intestine. **Am J Physiol**. 1982; 242: G448–54.
4. Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. **Am J Physiol**. 1983; 245: G285–9.
5. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol** 2003; 552(2): 335–44.
6. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**. 2002; 82(1): 47–95.
7. Vijayalaxmi, Meltz LM, Reiter RJ, et. al. Melatonin and protection from genetic damage in blood and bone marrow: whole-body irradiation studies in mice. **J Pineal Res**. 1999; 27: 221–225.
8. Çakatay U. Pro-oxidant actions of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Med Hypotheses** 2006; 66(1): 110–7.
9. Lee SR, Im KJ, Suh S, et. al. Protective effect of green tea polyphenol (-) epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates. **Phytother Res**. 2003; 17(3): 206–9.
10. Nakagawa K, Kawagoe M, Yoshimura M, et. al. Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generator in hepatic lysosomal fractions of mice. **J Health Science** 2000; 46: 509–512
11. Kahraman A, Erekasap N, Serteser M, et. al. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **J Nephrol**. 2003; 16: 219–224.
12. Coldiron AD, Sanders RA, Watkins JB. Effects of combined quercetin and coenzyme Q₁₀ treatment on oxidative stress in normal and diabetic rats. **J Biochem Mol Toxicol**. 2002; 16: 197–202.
13. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury. A review in relation to free tissue transfers. **Microsurgery** 2004; 24: 468–475.
14. Akkoç H. Ischemia-Reperfusion-Induced Injury of Myocardium. **Dicle Tıp Dergisi** 2008; 35(3); 211–215.

15. İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. Part 1 Biochemical mechanism **Norol Bil D.** 2000; 17: 2.
16. Mathes SJ, Nahai F. Reconstructive Surgery. **Principles, Anatomy and Technique Volume 1** 1997; 39–46.
17. Morin D, Hauet T, Spedding M, et. al. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2001; 49(1–2); 151–174.
18. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **Am J Surg.** 1991; 161: 488–502.
19. Mc Cord. Oxygen-derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. P.159–163. Ed. F. H. Epstein. In (Mechanism of disease), **N Engl J Med.** 1985; 17.
20. İşlek H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. **J Neurol Sci.** 2000; 72: 1984–2000.
21. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, et. al. Pathophysiology of ischemia reperfusion Injury, central Role of the neutrophil. **Br J Surg.** 1997; 78: 651–5.
22. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, et. al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. **Hepatology** 2000; 32: 169–173.
23. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, et. al. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine, **Transplantation** 1993; 55: 1265–72.
24. Onishi I, Shimizu K, Tani T, et. al. JNK activation and apoptosis during ischemia-reperfusion. **Transplant Proc.** 1999; 31: 1077–79.
25. Göğebakan Ö. Amrinon ve Sildenafil Sitratin Akut Mezenterik İskemi-Reperfüzyon Hasarında Bakteriyel Translokasyona Etkisi. Uzmanlık Tezi, Fırat üniversitesi Tıp Fak. Genel cerrahi A. D. Elazığ, 2006.
26. Belkin M, La Morte WL, Wright JG, et. al. The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. **J Vasc Surg.** 1989; 10: 14–18.
27. Horgan MJ, Ge M, Gu J et. al. Role of ICAM–1 in neutrophil mediated vascular injury after occlusion and reperfusion. **Am J Physiol.** 1991; 259: L315-L319.
28. Lefer DJ, Scalia R, Campbell B, et. al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. **J Clin Invest.** 1997; 4: 684–691.
29. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. **Clin Biochem.** 1993; 26: 351–7.

30. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte endothelial adhesion molecules. **Blood**. 1994; 84: 2068–2101.
31. Okada Y, Copeland BR, FitrIDGE R, et. al. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. **Stroke** 1994; 25: 1847–54.
32. Gute DC, İshida T, Yarimizu K, et. al. İnflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. **Mol Cell Bio**. 1998; 179: 169–187.
33. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. **Am J Physiol**. 1998; 254: H823- H827.
34. Schlag MG, Harris KA, Potter RF. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. **Am J Physiol Heart Circ physiol**. 2001; 280(4): H1716-H1721.
35. Charles D, Collard MD, Simon GMD, et. al. Pathophysiology, Clinical Manifestations and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. **Anesthesiol**. 2001; 94: 1133–8
36. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, et. al. Complement activation Following Oxidative stres. **Mol Immunol**. 1999; 36: 941–8.
37. Harem MK. Mast hücre proteazları ve biyolojik önemi. **Sağlık Bilimleri Dergisi**. 2005; 14(1): 61–67.
38. McNeil HP, Gotis-Graham I. Human mast cell subsets-distinct functions in inflammation. **Inflamm Res**. 2000; 49: 3–7.
39. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, et. al. **Temel Patoloji**. İstanbul Nobel Tıp Kitabevi 2000; 3–24.
40. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. **J Pathol**. 2000; 190(3): 255–66.
41. Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. **Surg Today** 2005; 35(3): 185–95.
42. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. **Crit Care Med**. 1993; 21(9): 1376–86.
43. Vejchapipat P, Williams SR, Spitz L, at. al. Intestinal metabolism after ischemia reperfusion. **J Pediatr Surg**. 2000; 35(5): 759–64.
44. Hamar J, Racz I, Cız M, et. al. Time Course of Leukocyte ResponS and Free Radical Release in an Early Reperfusion Injury of the Superior Mesenteric artery. **Physiol Res**. 2003; 52: 417–23.
45. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **FASEB J**. 1997; 11: 118–124.

46. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford, Oxford University 1999.
47. Gutteridge JM. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chem Biol Interact.** 1994; 91: 133–140.
48. Reiter RJ. Melatonin as an antioxidant. Biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochim Pol.** 2003; 50(4): 1129–46.
49. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am J Med.** 1991; 91: 14S-22S.
50. Meister A. Glutathione, Ascorbate and cellcycle regulation. **FEBS Letter** 1994; 1–4.
51. Southorn P, Powis G. Free radical in medecine I. Chemical nature and biological reactions. **J Mayo Clin Proc.** 1988; 63: 381–8.
52. <http://www.healthchecksyste.ms.com/antioxid.htm>.
53. Freidovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species or what's the matter with oxygen? **Ann N Y Acad Sci.** 1999; 893: 13.
54. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. **Ann N Y Acad Sci.** 2000; 899: 1.
55. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys.** 1986; 246: 501–514.
56. Winterbourn C.C. and Kettle A.J. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. **Biochem Biophys Res Commun.** 2003; 305: 729–736.
57. Dizdaroğlu M. Mechanisms of Oxidative DNA Damage; Lesion and Their Measurement. **Kluwer Academic/Plenum Publihers** 1999; 302: 67–87.
58. Wetberg AB, Weitzman SA, Clarck EP. Effetcs on antioxidants on antioxidant induce: sister chromatid Exchange formation. **J Clin Invest.** 1985; 75(6): 35 –41.
59. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. **J Lancet** 1984; 23(3): 1396–7.
60. Slater TF. Free radical mechanismin tissue injury. **J Biochem.** 1984; 222: 1–15.
61. Tappel AL, Dillard JC. İnvivo lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. **J Federation Proceedings** 1981; 40(3): 174– 8.
62. Akkuş İ. **Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri.** Konya Mimoza Yayınları, 1. Baskı, 1995; 1–84.
63. Mccord JM. The evolution of free radicals and oxidative stres. **Am J Med.** 2000; 108: 652–659.
64. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **J Clin Chem.** 1995; 42: 18–19.

65. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **TIBS**. 1997; 22: 477–481.
66. Utsumi K, Takehara Y, Inai Y, et. al. Oxygen-dependent regulation of biological functions by nitric oxide. The mitochondrial production of oxygen radicals and cellular aging. Understanding the process of aging Ed. b/Cadenas E Packer L 15th. Ed. New York 1999; 60.
67. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet** 1994; 344: 721–724.
68. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide, Physiology, patophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**. 1991 Jun; 43(2): 109–42.
69. Canbaş A. **Gıda Bil Ve Teknolojisi**. Ziraat Fakültesi Yayını No: 78 Ç.Ü. Adana 1983.
70. Sies H, De Groot H. Role of Reactive Oxygen Species in Toxicity. **J Toxicol**. 1992; 64 (65): 547–51.
71. Greenstock C.L. Radiation and aging: Free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. **Med Hypotheses**. 1993; 41: 473–482.
72. Ikeda J. Lipid Peroxidation Products And Carcinogenesis, 1993; 76: 1235–1240.
73. Bishop ML, Janet LP. Free radicals in clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations. Third edition. Philadelphia New York 1996; 765–777.
74. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution, physiology. **Acta Physiol Scand (suppl)**. 1986; 548: 87–99.
75. Jarasch ED, Bruder G, Heid HW. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. **Acta Physiol Scand (suppl)**. 1986; 548: 39–46.
76. Grisham MB, Hernandez LA, Grandner DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischaemia. **Am J Physiol**. 1988; 251: G567- G574.
77. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **Am J Surg**. 1991; 161(4): 488–503.
78. Lorente L, Aller MA, Arias JL, et. al. Clinical biology of nitric oxide. **Br J Surg**. 1996; 83(7): 1010–1.
79. Mead J. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. Free radical in molecular biology. **J Aging and Disease** 1984; 65(24): 53–66.
80. Natarajan V. Oxidants and signal transduction in vascular endothelium. **J Clin Med**. 1995; 125(35): 26–37.
81. Ball S, Weindruch R, Walford L. Antioxidants and immun response. **J Free Radicals Aging and Dejenervative Diseases** 1986; 427–456.

82. Van der Vliet A, Bast A. Effect of oxidative stress on receptors and signal transmission. **Chem Biol Interact.** 1992; 85: 95–116.
83. Urso M.L, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology** 2003; 189: 41–54.
84. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases, **Free Radical Biol Med.** 2000; 28: 1685–1696.
85. Uchida K. 4-Hydroxy-2-Nonenal: A product and mediator of oxidative stress, **Progr. Lip Res.** 2003; 569: 1–26.
86. Kaynak K. Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. **Solunum** 2002; 4: 468–473.
87. Kolanjiappan K, Ramachandran C.R, Manoharan S. Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. **Clin Biochem.** 2003; 36: 61–65.
88. Baykal Y, Kocabalkan F. Serbest radikaller ve hücre hasarı. **Sendrom** 2000; 9: 31–9.
89. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. **Türkiye Klinikleri** 1989; 1: 1–8.
90. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte endothelial adhesion molecules. **Blood.** 1994; 84: 2068–2101.
91. Lefer DJ, Scalia R, Campbell B, et. al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. **J Clin Invest.** 1997; 4: 684–691.
92. Most D, Hoyt J, Sibley RK, et. al. Parenchymal cytokine expression precedes clinically observed ischaemia in dorsal flaps in the rat. **Plast Reconstr Surg.** 1996; 98: 856–861.
93. Yalçın AS. Antioksidanlar. **Klinik Gelişim II** 1998; 342–6.
94. Rangan U, Bulkley GB: Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. **Br Med Bull.** 1993; 49(3): 700–18.
95. Bulmuş G.F. Kronik hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda alfa-lipoik asidin plazma ve çeşitli dokularda oksidan antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bil. Enstitüsü Biyokimya A. D.Elazığ, 2006.
96. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem.** 1969; 244(22): 6049–55.
97. Karabiga M. Aprotinin'in Deneysel Aortik İskemi Reperfüzyon Modelinde Böbrek Hasarı Üzerine Etkisi. T. C. Süleyman Demirel Ü. Tıp Fak. Uzmanlık tezi, Isparta 2006.
98. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in Bioscience** 1999; 4: 339–345.

99. Whittaker M, Whittaker JW. A glutamate bridge is essential for dimer stability and metal selectivity in manganese superoxide dismutase. **J Biol Chem.** 1998; 273: 22188–22193.
100. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et. al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.** 2006; 160(1): 1–40.
101. Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. **Mol Cell Endocrinol.** baskıda 2006.
102. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med.** 1967; 70 (1): 158–69.
103. Shidhu P. Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. **Chemico-Biological Interactions** 2004; 150: 199–209.
104. Liebert J, Matlawska I, Bylka W, et. al. Protective effect of aquilegia vulgaris on APAP induced oxidative stress in rats. **J Ethnopharm.** 2005; 97: 351–358.
105. Sözmen E.Y. Yaşlanma Biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sözmen ET (editörler). **İnsan Biyokimyası** 1. Baskı, Ankara 2002; 667–672.
106. Steinberg D. Is there a potential therapeutic role for vitamin E or other antioxidants in atherosclerosis? **Curr Opin Lipitol.** 2000 Dec; 116: 603–7.
107. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. **Annu Rev Nutr.** 1996; 16: 33–50.
108. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and it's function in membranes. **Prog Lipit Res.** 1999 Jul; 384: 309–36.
109. Mendiratta S, Zhi-chao QU, James M. Enzyme Dependent Ascorbate Recycling in Human Erythrocytes: Role of Thioredoxin Reductase, **Free Radical Biol Med.** 1998 Jul; 252: 221–228.
110. Gruszecki WI, Strzalka K. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. **Biochim Biophys Acta.** 2005 May 30; 17402: 108–15.
111. Droge K, Schulze-Osthoff S, Mihm D, et. al. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. **FASEB J.** 1994; pp.1131–1138.
112. Haddad JJ, Olver RE, Land SC. Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF- κ B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells. **J Biol Chem.** 2000; 275 (28): 21130–21139.
113. Becker BF, Reinholz N, Leipert B, et. al. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. **Chest** 1991; 100: 176–181.
114. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, et. al. Melatonin and mitochondrial function. **Life Sci.** 2004; 75(7): 765–90.
115. Brzezinski A. Melatonin in humans. **N Engl J Med.** 1997; 336(3): 186–95.

116. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, et. al. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neurosci Biobehav Rev.** 1993; 17(3): 347–57.
117. Smith A.R, Shenvi SV, Widlansky M, et. al. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stres. **Curr Med Chem.** 2004; 11: 1135–1146.
118. Liang JF, Akaike T. Inhibition of nitric oxide synthesis in primary cultured Mouse hepatocytes by α -lipoic acid. **Chem Biol Interact.** 2000; 124(1): 53–60.
119. St. Clair D, Zhao Y, Chaiswing L, et. al. Modulation of skin tumorigenesis by SOD. **Biomed Pharm** 2005; 59: 209(4)-14.
120. [Marcjoephnutrition.com//06/lipoic acid.jpg](http://marcjoephnutrition.com/06/lipoic%20acid.jpg)
121. Goralska M, Dackor R, Holley B, et. al. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epiteial cells. **Exp Eye Res.** 2003; 76(2): 241–8.
122. Pfaffly JR. Lipoic acid: The Antioxidant Chameleon. **Free Radicals in Biol Med**, Biosciences Department, The University of Iowa. 2001; 77: 222.
123. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological Antioxidant. **Free Radical Biol Med.** 1995; 19: 227–250.
124. Packer L. Antioxidant propertis of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts. **Ann N Y Acad Sci.** 1994; 738: 257–264.
125. Moini H, Packer L, Saris NE. Antioxidant and Prooxidant Activities of α - Lipoic acid and Dihydrolipoic Acid. **Toxicol and Appl Pharmacol.** 2002; 182: 84–90.
126. Pfaffly JR. Lipoic acid: **The antioxidant chameleon** 2001.
127. Packer LX, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. **Nutrition** 2001; 17: 888–895.
128. Nijveldt RJ, Nood E, Hoorn DEC, et. al. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. **Clin Nutr.** 2001; 74: 418–425.
129. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutr Res.** 1998; 18: 1995–2018.
130. White J N, Snounou G. The co-existence of Plasmodium: sidelights from falciparum and vivax malaria in Thaliand. **Trends in Parsitology** 2004; 20: 333- 339.
131. Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoidler. **KocatepeTip Dergisi** 2002; 3: 01–08.
132. Pannala AS, Rice-Evans C. In: Flavonoids and Other Polyphenols (Methods in Enzymology Vol. 335); Packer L. Ed. Academic Press, San Diego. 2001; 266–72.
133. Ren W, Qiao Z, Wang H, et. al. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. **Med Res Rev.** 2003; 4 (23): 519–534.

134. Elliott M, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol Rev.** 2000; Vol 52(4): 673–751.
135. Schroeter H, Spencer JPE, Rice-Evans C. Current status of the potential role of flavonoids in neuroprotection. Critical reviews of oxidative stress and aging: advances in basic science, diagnostics and intervention. ed.by Cutler R.G, Rodriguez H, Vol. I, World Scientific Publishing Singapore. 2003; p.137.
136. Tanakol R. Antioksidan vitaminler; Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. **Klinik Gelisim** 1998; 11: 347–357.
137. Burak M, Çimen Y. Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. **T Klin J Med.** 1999; 19: 296–304.
138. Kahraman A, İnal ME. Protective effects of quercetin on ultraviolet a light induced oxidative stres in the blood of rat. **J Appl Toxicol.** 2002; 22: 303–309.
139. Lenton KJ, Therriault H, Fulop T, et. al. Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human Iymphocytes. **Carcinogenesis** 1999; 20: 607–613.
140. Tadolini B, Franconi F. Carvedilol inhibition of lipid peroxidation. A new antioxidative mechanism. **Free Radic Res.** 1998; 29: 377–387.
141. Van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, et. al. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. **Biochem Biophys Res Commun.** 1995; 214: 755–9.
142. Priya S.D, Shyamala Devi C.S. Protective effect of quercetin in cisplatin induced cell injury in the rat kidney. **Indian J Pharmacol.** 1999; 31: 422–426.
143. Robert JN, Els N, Danny EC. H, et. al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr.** 2001; 74: 418–443.
144. Kahraman A. Ultraviole A (UVA) Işığının Oluşturduğu Oksidatif Stres Üzerindeki Quercetinin rolü. Doktora Tezi. 1998.
145. Elliott M. Jr, Chithan K. et. al. Free radical scavenging and antioxidant of plant flavonoids. Plenum Pres New York. 1994.
146. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, et. al. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **Br Med J.** 1996; 312: 478–481.
147. Arivazhagan P, Panneerselyam SR, Panneerselyam C. Effect of DL-alphaipoic acid on the status of lipid peroxidation and lipids in aged rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 2003; 58: 788–791.
148. Beutler E: Red Cell Metabolism. A manual of biochemical methods. 2nd edition, Grune and Stratton Inc, New York; 1984.

149. Fridovich I: Superoxide dismutase. **Adv Enzymol.** 1974; 4: 35–97.
150. Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** 1979; 95: 351–358.
151. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et. al. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** 1951; 193:265–275.
152. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. **FEBS Lett.** 1975; 59: 245–249.
153. Devinder Singh, Chander V, Chopra K. The Effect of Quercetin, a Bioflavonoid on Ischemia/Reperfusion Induced Renal Injury in Rats. **Arch Med Res.** 2004 Nov-Dec; 35(6): 484–94.
154. Dulundu E, Özel Y, Topaloglu U, et. al. Alpha-Lipoic Acid Protects against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. **Pharmacol.** 2007; 79(3).
155. Yoshida WB, Alasio T, Maziotta R, et. al. Effect of alpha tocopherol, taurine and selenium on the attenuation of ischemia/reperfusion injury of splanchnic organs. **Cardiovascular Surgery** 1998; 6: 178–187
156. Karaayvaz M, Öztürk HS, Elgün S, et. al. İntestinal ischemia and free radical metabolism. **T Klin J Med Sci.** 1996; 16: 437–439
157. Uz ZM. Radyasyonla oksidatif hasar oluşturulan ratlarda CoQ₁₀ ve Quercetin'in birlikte verilmesinin koruyucu etkisi. Uzmanlık tezi, Osman Gazi Ü. T. Fak. Biy. A. D. Eskişehir 2004.
158. Yoshida WB, Alasio T, Maziotta R, et. al. Effect of alpha tocopherol, taurine and selenium on the attenuation of ischemia/reperfusion injury of splanchnic organs. **Cardiovascular Surgery** 1998; 6: 178–187
159. Başay S, Adsan Ö, İnal G, et. al. Verapamil ve alfa-tokoferolün rat böbreğindeki deneysel reperfüzyon hasarı üzerine karşılaştırılmalı etkileri. **Türk Üroloji Dergisi** 2003; 29 (1): 11–15
160. Arıcı M. Kas Flepleri iskemi reperfüzyon hasarında quercetin'in etkileri. Uzmanlık tezi, Osman Gazi Ü. T. Fak. Plastik C. Eskişehir, 2006.
161. Ceran C, Sönmez K, Türkyılmaz Z, et. al. Effect of bilirubin in ischemia/reperfusion injury on rat small intestine. **J Pediatr Surg.** 2001;36(12):1764–7.
162. Juel IS, Solligard E, Lyng O, et. al. Intestinal injury after thoracic aortic cross-clamping in the pig. **J Surg Res.** 2004;117(2): 283–95.
163. Önder A. İntestinal İskemi-Reperfüzyon Hasarının önlenmesinde Çinko, Alfa tokoferol, buflomedil, pentoksifilin ve ikili kombinasyonlarının rolü. K.S.Ü. T. Fak. Uzmanlık tezi, Kahraman Maraş 2007.

- 164.** İnal M, Altınışık 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
- 165.** Singh D, Chander V, Chopra K. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. **Arch Med Res.** 2008; 39(7): 714.
- 166.** Polat C, Tokyol C, Kahraman A, et. al. The effects of desferrioxamine and quercetin on hepatic ischemia-reperfusion induced renal disturbance. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** 2006; 74(6): 379–83.
- 167.** Tokyol C, Yilmaz S, Kahraman A, et. al. The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats. **Acta Chir Belg.** 2006; 106(1): 68-72.
- 168.** Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. **Biosci Biotechnol Biochem.** 1999; 63(10): 1787–90.
- 169.** Sanhueza J, Valdes J, Campos R, et. al. Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia-reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol.** 1992 Nov; 78(2): 211–8
- 170.** Lee SR, Im KJ, Suh S, et. al. Protective effect of green tea polyphenol (-) epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gebril brain homogenates. **Phytother Res.** 2003; 17(3): 206–9.
- 171.** Bulmuş GF. Kronik hiperhomosisteinemi oluşturulan ratlarda alfa-lipoik asidin plazma ve çeşitli dokularda oksidan antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması Doktora Tezi, Fırat Ü. Biy. A. D. Elazığ. 2006.
- 172.** Cosar E, Sahin FK, Köken G, et. al. The protective effect of alpha-lipoic acid in experimental ovarian ischaemia-reperfusion injury. **Aust N Z J Obstet Gynaecol.** 2007 Dec; 47(6): 499–503.
- 173.** Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U et. al. Alpha-lipoic acid protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **Pharmacol.** 2007; 79(3): 163–70.
- 174.** Kuzu MA, Köksoy C, Kale IT, et. al. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. **Am J Surg.** 1998; 176: 348–351.
- 175.** Demir S, Erden Mİ. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. **Clin Chim Acta.** 1998; 275: 127–135.
- 176.** Guven A, Tunc T, Topal T, et. al. Alpha-lipoic acid and ebselen prevent ischemia/reperfusion injury in the rat intestine. **Surg Today** 2008; 38(11): 1029–35.

