



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**ASTAKSANTİN'İN A. CAROTIS COMMUNIS İSKEMİ-
REPERFÜZYON MODELİ UYGULANAN SIÇANLARDA
ANTİOKSİDAN SİSTEM VE BEYİN ÜZERİNDEKİ
KORUYUCU ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

BENGİ YEĞİN

**DANIŞMAN
PROF. DR. HİLMİ ÖZDEN**

2018



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**ASTAKSANTİN'İN A. CAROTIS COMMUNIS İSKEMİ-
REPERFÜZYON MODELİ UYGULANAN SIÇANLARDA
ANTİOKSİDAN SİSTEM VE BEYİN ÜZERİNDEKİ
KORUYUCU ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

BENGİ YEĞİN

**DANIŞMAN
PROF. DR. HİLMİ ÖZDEN**

KABUL VE ONAY SAYFASI

BENGİ YEĞİN'in Doktora Tezi olarak hazırladığı "Astaksantin'in A. Carotis Communis İskemi-Reperfüzyon Modeli Uygulanan Sıçanlarda Antioksidan Sistem ve Beyin Üzerindeki Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

09/10/2018

Üye: Prof. Dr. Hilmi Özden



Üye: Prof. Dr. Ferruh YÜCEL



Üye: Prof. Dr. Sibel CANBAZ KABAY



Üye: Prof. Dr. Ayhan CÖMERT



Üye: Dr. Öğretim Üyesi Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/10/2018 tarih ve 194/5933 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü



ÖZET

Başlık:

Çalışmamız; "Astaksantin'in A. Carotis Communis İskemi-Reperfüzyon Modeli Uygulanan Sıçanlarda Antioksidan Sistem ve Beyin Üzerindeki Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi" üzerine yoğunlaşmıştır.

Amaç:

İskemiye karşı en duyarlı organ olan cerebrum'da iskemi sonucunda oluşan hastalıklar günümüzde oldukça yaygın, sosyal ve ekonomik sorunlara yol açmaktadır. Organizmanın oluşturduğu antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalmasıyla artan serbest radikaller başta kanser olmak üzere çok çeşitli hastalıklara ve yaşlılığa neden olmaktadır.

Çalışmamızda kuvvetli bir antioksidan olan Astaksantin'in (ASX), antioksidan sistem ile beyin üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Kapsam:

Araştırmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Her grupta 8 adet sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturularak deneyde 32 adet erkek sıçan kullanıldı.

Yöntem:

Çalışmamızda a. carotis communis iskemi reperfüzyon modeli oluşturulan sıçanlarda farklı dozlarda uygulanan ASX'in koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Sıçanlara cerrahi işlemlerden 30 dk. önce intraperitoneal (i.p.) yoldan dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözündürülmüş ASX veya sadece DMSO verildi. Sıçanlar 15 dk.lık iskeminin ardından 24 saat reperfüzyona bırakıldıktan sonra dekapite edildi. İntrakardiyak yolla kan örnekleri alınarak; Superoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Malondialdehit (MDA) düzeyleri tespit edildi.

İntrakardiyak perfüzyondan sonra sıçan cerebrumları çıkartılarak histolojik değerlendirmeler yapıldı.

Bulgular:

Histolojik sonuçlarda; Sham grubuna ait cerebrum korteksinde Kontrol grubuna göre yoğun hasar ve çok sayıda nekrotik nöron gözlenmiştir. ASX verdiğimiz deney gruplarında ise azalmış hasarla birlikte normal görünümlü nöronlar gözlenmiştir. Bu durum ASX'in beyin üzerinde tam değil kısmî koruyucu etki yaptığını göstermektedir.

Biyokimyasal sonuçlara göre SOD ve CAT değerlerinde Sham grubunda anlamlı düzeyde düşüş gözlenmesi, iskemi sonrası artan serbest radikaller karşısında antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığını göstermektedir. ASX verilen gruplarda ise anlamlı bir artış gözlenmesi, ASX'in antioksidan sistem üzerinde anlamlı bir koruyucu etki yaptığını göstermektedir.

MDA değerlerinde ise Sham grubunda anlamlı bir artış gözlenmesi, iskemi sonrası cerebrum'da oksidatif hasar oluştuğunu göstermektedir. ASX verilen ASX25mg/kg grubunda anlamlı bir düşüş gözlenmesi, ASX'in beyin üzerinde anlamlı bir koruyucu etki yaptığını göstermektedir. ASX75mg/kg grubu değerlerinin Kontrol grubu değerlerinin de altına düşmesi bu dozda ASX'in beyin üzerinde tam (%100) koruyucu etki yaptığını göstermektedir.

Sonuç:

Histolojik bulgular, beyinde oluşan hasarlara karşı ASX'in kısmi olarak koruyucu etki sağladığını göstermektedir.

Biyokimyasal sonuçlar ASX'in; antioksidan savunma sistemi üzerinde anlamlı bir şekilde koruyucu etki sağladığını; oksidatif hasara karşı ise 75mg/kg dozunda tam koruyucu etki sağladığını göstermektedir.

Histolojik bulguların değerlendirilmesinde daha objektif ve kesin sonuçlara ulaşmak için tespit edilen değişimlerin gruplandırılmasının yanında, nicel analiz ve değerlendirmeler yapılması uygun olacaktır.

Anahtar kelimeler: İskemi-Reperfüzyon, a. carotis communis, serbest radikaller, antioksidan, astaksantin, cerebral iskemi modelleri, doku hasarı.

SUMMARY

Title:

Our study; "Protective Effect on Antioxidant System and the Brain in Common Carotid Artery Ischemia-Reperfusion Model of the Rat".

Aim:

Diseases resulting from ischemia in the brain, which is the most sensitive organ against ischemia, are now common and lead to social and economic problems. Increased free radicals caused by insufficiency of the antioxidant defense system that the organism has created cause various diseases and aging especially cancer.

In our study, we aimed to investigate the protective effect of ASX, a potent antioxidant, with the antioxidant system on the brain.

Content:

Our research was carried out at Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine Department of Anatomy. In each group, 8 rats were divided into 4 groups and 32 male rats were used in the experiment.

Method:

In our study was investigated for the protective effect of ATX administered at different doses common carotid artery ischemia-reperfusion model in rats. Rats were given DMSO and ATX intraperitoneally 30 minutes before surgery. Ischemia was applied for 15 minutes. The rats were decapitated after 24 hours of reperfusion. Intracardiac blood samples were taken; Malondialdehyde (MDA), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) levels were determined.

Results:

Histological results; In the cerebrum cortex of the Sham group compared to the control group were observed severe damage and multiple necrotic neurons. In the experimental groups given ASX were observed normal-looking neurons with decreased damage. This shows that ASX has a partial protective effect on the brain.

According to the biochemical results, a significant decrease in the sham group in SOD and CAT values indicates that the antioxidant defense system was insufficient in the face of increased free radicals after ischemia. A significant increase in the ASX-treated group shows that ASX has a significant protective effect on the antioxidant system.

A significant increase in MDA values in the Sham group indicates that oxidative damage occurred in the cerebrum after ischemia. A significant decrease in ASX25mg/kg group indicates that ASX has a significant protective effect on the brain. When ASX75mg/kg group values fall below the control group values, this dose shows that ASX has a complete (100%) protective effect on the brain.

Conclusion:

Histological findings show that ASX provides a partial protective effect against brain damage.

Biochemical results; ASX has a significant protective effect on the antioxidant defense system and at 75mg/kg against oxidative damage.

In order to reach more objective and definite results in the evaluation of histological findings, it is appropriate to carry out quantitative analyzes and evaluations as well as grouping the determined changes.

Key words: Ischemia-reperfusion, common carotid artery, free radicals, antioxidant, astaxanthin, cerebral ischemia models, tissue damage .

İÇİNDEKİLER

Sayfa no:

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL ve ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO DİZİNİ	xi
ŞEKİL DİZİNİ	xii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Cerebrum'un Vasküler Anatomisi	5
2.1.1 Aorta	5
2.1.1.1 Arcus aortae	5
2.1.1.1.1 A. carotis communis	5
2.2 İskemi	9
2.3 Reperfüzyon	11
2.4 Cerebral İskemi	12
2.5 Cerebral İskemi Modelleri	14
2.5.1 Fokal Cerebral İskemi	14
2.5.2 Global Cerebral İskemi	15
2.5.3 Ön Cerebral İskemi	15
2.6 Deney Hayvanları Olarak Kemirgenlerin Kullanılması	15

2.7	Serbest Radikaller	16
2.7.1	Serbest Radikallerin Kaynakları	17
2.7.1.1	Endojen kaynaklar	17
2.7.1.2	Eksojen kaynaklar	19
2.7.2	Serbest Radikallerin Türleri	19
2.7.3	Serbest Radikallerin Yararları	21
2.7.4	Serbest Radikallerin Zararları	22
2.7.5	Serbest Radikallerin Cerebrum Üzerine Etkileri	24
2.8	Antioksidanlar	24
2.8.1	Antioksidan etki mekanizmaları	25
2.8.2	Antioksidan savunma sistemleri	28
2.8.2.1	Süperoksit dismutaz enzimi (SOD)	28
2.8.2.2	Katalaz (CAT)	29
2.8.2.3	Glutasyon (GSH)	29
2.8.2.4	Glutaiyon Peroksidaz (GSH-Px)	29
2.8.2.5	Ksantin oksidaz (KO)	30
2.9	Astaksantin	30
2.9.1	Karotenoidler	30
2.9.2	Astaksantin'in bilim dünyasında bilinmesi	31
2.9.3	Astaksantin'in Kaynakları	32
2.9.4	Astaksantin'in Endikasyonları	33
2.9.5	Astaksantin'in Antioksidan Etkisi	34
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1	Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları	35

3.2	Deney Grupları	35
3.2.1	Kontrol grubu	35
3.2.2	Sham grubu	36
3.2.3	Deney grubu 1 (Astaksantin 25 mg/kg)	36
3.2.4	Deney grubu 2 (Astaksantin 75 mg/kg)	36
3.3	Cerrahi İşlemler	36
3.4	Dokuların Diseksiyonu	39
3.5	Kanların Biyokimyasal Analizleri	41
3.5.1	Superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü	41
3.5.1.1	Ölçüm yöntemi	42
3.5.2	Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü	43
3.5.2.1	Çözeltiler	43
3.5.3	Malondialdehit (MDA) düzeyi ölçümü	43
3.5.3.1	Çözelti Hazırlama	44
3.5.3.2	Spektrofotometrede okuma	44
3.5.3.3	Hesaplama	44
3.6	Dokuların Histolojik İşlemleri	45
3.7	İstatistiksel Analizler	46
4.	BULGULAR	47
4.1	Histolojik Sonuçlar	47
4.2	Biyokimyasal Sonuçlar	51
4.2.1	SOD değerleri	51
4.2.2	CAT değerleri	52
4.2.3	MDA değerleri	53

5.	TARTIŞMA	54
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	59
	KAYNAKLAR DİZİNİ	64
	ÖZGEÇMİŞ	74



TABLO DİZİNİ

Sayfa no:

Tablo 2.1	Serbest radikal türleri	20
Tablo 2.2	Endojen Antioksidanlar	26
Tablo 2.3	Eksojen Antioksidanlar	27
Tablo 4.1	Gruplara ait SOD düzeylerinin dağılımı	51
Tablo 4.2	Kanda CAT değerleri	52
Tablo 4.3	Kanda MDA değerleri	53



ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa no:

Şekil 2.1	Vagina carotica ve içerisinde yer alan yapılar	6
Şekil 2.2	A. carotis communis'in boyundaki seyri	6
Şekil 2.3	A. carotis externa ve dalları	7
Şekil 2.4	Hemispherium cerebri'nin lateral yüzeyinden görüntü	8
Şekil 2.5	Hemispherium cerebri'nin medial yüzeyinin beslenmesi	8
Şekil 2.6	İskemi oluşum mekanizmasının şematik olarak tarifi	10
Şekil 2.7	Membran hasar mekanizması	10
Şekil 2.8	Endoplazmik retikulum ve mitokondride meydana gelen değişiklikler	11
Şekil 2.9	Beyin İskemi Reperfüzyon mekanizması şematik gösterimi	13
Şekil 2.10	Oksidan ürün oluşumu	18
Şekil 2.11	Haber Weiss ve Fenton reaksiyonları	21
Şekil 2.12	Lipid peroksidasyon'un etkileri	23
Şekil 2.13	Hücre hasarı	24
Şekil 2.14	Hücresele seviyede antioksidan etkinlik.	28
Şekil 2.15	Astaksantin	31
Şekil 2.16	Astaksantin'in kimyasal yapısı	31
Şekil 2.17	Haematococcus pluvialis'de astaksantin biyosentezi	32
Şekil 3.1	Sıçana intramusküler anestezi yapılması	36
Şekil 3.2	A. carotis communis'in ortaya çıkarılması	37
Şekil 3.3	A. Carotis communis sinistra'nın ortaya çıkarılıp klemp takılması	38
Şekil 3.4	Derinin sütur kullanılarak dikilmesi	38

Şekil 3.5	Sıçan thorax bölgesinin açılması ve kan alımı	39
Şekil 3.6	Sıçanın perfüze edilmesi	40
Şekil 3.7	Sıçan beyninin dikkatlice çıkarılması	41
Şekil 3.8	Süperoksit Dismutaz ölçümünün şeması	42
Şekil 3.9	MDA standart eğrisi	45
Şekil 4.1	Kontrol grubu sonuçları	47
Şekil 4.2	Sham grubu sonuçları	48
Şekil 4.3	ASX25mg/kg grubu sonuçları	49
Şekil 4.4	ASX75mg/kg grubu sonuçları	50
Şekil 4.5	Gruplara ait SOD düzeylerinin dağılımı	51
Şekil 4.6	Kanda CAT değerleri	52
Şekil 4.7	Kanda MDA değerleri	53

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

3R	:	Reduce-Reuse-Recycle (Azalt-Yeniden Kullan-Geri Dönüştür)
a.	:	Arteria
ACA	:	A. cerebri anterior
ACC	:	A. carotis communis
ACI	:	A. cerebri interna
ADP	:	Adenozin Difosfat
AMP	:	Adenozin Monofosfat
ASX	:	Astaksantin
ATP	:	Adenozin Trifosfat
ATPaz	:	Adenozin Trifosfataz
Ca	:	Kalsiyum
Ca ⁺²	:	Kalsiyum iyonu
CAC	:	Uluslararası Gıda Kodeksi Komisyonu
cAMP	:	Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	:	Katalaz
cm	:	Santimetre
CO ₂	:	Karbondioksit
Cr	:	Bakır
Cu	:	Krom
ddH ₂ O	:	Double distilled su
dk.	:	Dakika
DMSO	:	Dimetilsülfoksidad [(CH ₃) ₂ SO]
DNA	:	Deoksiribonükleik asit

EC SOD	:	Ekstrasellüler dismutaz
eNOS	:	Endoteliyal NOS
Fe ⁺³	:	Demir iyonu
GSH	:	Glutatyon
GSH-Px	:	Glutatyon peroksidaz
GSSH	:	Oksitlenmiş Glutatyon
H	:	Hidrojen
HADYEK	:	Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksit
H ₃ PO ₄	:	Fosforik asit
HClO ₄	:	Perklorik asit
HE	:	Hematoksilen-Eozin
HOCl	:	Hipokloröz Radikali, Hipoklorik asit
HOONO	:	Hidroksinitrit
IL-1	:	İnterlökin-1
iNOS	:	Uyarılabilir NOS
İ-R	:	İskemi-reperüzyon
iNOS	:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
İP	:	İntraperitoneal
K ⁺	:	Potasyum iyonu
KCl	:	Potasyum Klorür
KDH	:	Ksantin Dehidrojenaz
kg	:	Kilogram
KO	:	Ksantiz oksidaz

L	:	Lipid Serbest Radikalleri
l	:	Litre
LOO	:	Lipid Peroksid Radikalleri
LOOH	:	Lipid Peroksid
LPS	:	Lipopolisakkarit
MDA	:	Malondialdehit
Mg ⁺²	:	Magnezyum iyonu
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
Mm	:	Musculi
mmHg	:	milimetre civa
mmol	:	Milimol
Mn ⁺²	:	Manganez
Mo ⁵⁺	:	Molibden
MS	:	Multiple skleroz
n	:	Denek sayısı
Na ⁺	:	Sodyum iyonu
NAD ⁺	:	Nikotinamid adenin dinükleotid iyonu
NADP	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NaOH	:	Sodyum Hidroksit
NBT	:	nitroblue tetrazolium
NF-kB	:	Nükleer Faktör kappa B

nm	:	Nanometre
NMDA	:	N-metil D-aspartat
nmol	:	nanomol.
nNOS	:	Nöronal NOS
NO	:	Nitrik oksit
NO ₂	:	Nitrojen dioksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
O ₂ ⁻	:	Süperoksit Radikali
O ₂	:	Oksijen
OH	:	Hidroksil Radikali
ONOO	:	Peroksinitrit
PAF	:	Trombosit aktive edici faktör
Ph	:	Hidrojenin Gücü (Power of Hydrogen), potansiyel hidrojen (Potential Hydrogen)
PMNL	:	Polimorf Nüklear Lökosit
PUFA	:	Poliansatüre yağ asitleri
RNA	:	Ribonükleik asit
RNS	:	Reaktif nitrojen türleri
RNT	:	Reaktif nitrojen türleri
ROOH	:	Hidroperoksit
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
ROT	:	Reaktif Oksijen Türleri
rpm	:	Revolution per minute (devir/dakika)
Se	:	Selenyum

SOD	:	Süperoksit dismutaz
SOR	:	Serbest oksijen radikalleri
TBA	:	Tiyobarbitürik asit
TICAM	:	Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi
TÜİK	:	Türkiye İstatistik Kurumu
UNESCO	:	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (Birleşmiş Milletler Eğitim, Bilim ve Kültür Örgütü)
UV	:	Ultraviyole
v.	:	Vena
WST	:	Water-soluble tetrazolium salt
Zn	:	Çinko
μ	:	Mikrometre= mikron

1- GİRİŞ ve AMAÇ

Organizmanın en küçük birimi ve temel yapı taşı konumunda olan hücreler canlılığın tüm nitelik ve özelliklerini taşırlar. Hücreler genelde benzer özellikler gösterir ve yaşamlarını sürdürebilmeleriyle birlikte fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri için kan akımına ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle dolaşım sisteminin ana unsurlarından olan kan damarlarından belli bir akış içinde geçen kan akımı önem kazanmaktadır.

İnsan organizmasının hücre sayısı konusunda, çağımızda hızla ilerleyen teknolojiye rağmen henüz kesin bir bilgi verilememiştir. Yapılan bir açıklamada insandaki hücre sayısının otuz-kırk trilyon, bir başka açıklamada ise yüz trilyon olduğu belirtilmiştir. Bu hücrelerden milyonları aşan hücreler bir araya gelip dokuları, dokular organları, organlar da sistemleri; kısaca yüz trilyona varan hücreler bir bütün olarak organizmayı oluştururlar. Bunlar kan akımını her zaman kendi ihtiyaçlarını dikkate alarak hassas ve özenli bir biçimde kontrol eder. Bu kapsamda dokularda bulunan mikro-damarlar; dokunun ihtiyaçlarını, oksijen (O₂) ve besinin yeterli olup olmadığını, karbondioksit (CO₂) ve diğer atık maddelerin birikip birikmediğini kontrol eder. Besinlerden kimyasal yollarla O₂'nin yardımıyla elde edilen enerji, hücrelerin fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri için gerekli olmaktadır. Bu da arteriyel ve venöz kan akımının düzenli olması sayesinde mümkündür.

Damarlarda pıhtı ya da hava kabarcığı gibi nedenlerle embolinin oluşması, yahut dıştan gelen bir müdahale sonucu doku ve organlardaki kan akımının engellendiği görülebilir. Kan akımının hangi sebeple olursa olsun kısmen veya tamamen engellenmesiyle oluşan iskemi sonucunda ise O₂ yetersizliği nedeniyle doku hasarı ya da nekrozu oluşabilir. Ancak bu hasar veya nekroz her dokuda aynı oranda görülmeyip dokuların iskemiye hassasiyetleri farklılık gösterir. İskemiye en duyarlı organ cerebrum (beyin), en dayanıklı olan ise iskelet kaslarıdır.

İskeminin olduğu bölgeye göre farklı histolojik ve biyokimyasal bulgular görülmesinin nedeni iskemiye karşı hassasiyetten ileri gelmektedir. Ancak bu hassasiyet her organda farklı sonuçlar doğurmaktadır. Örneğin cerebrumda kalıcı ya da geçici felçlere, kalpte kardiovasküler hastalıklara sebep olur.

Kalp hastalıkları da kan akışının yeterli ölçüde sağlanamamasına, pıhtıların oluşmasına ve böylece cerebrumda oluşacak çok sayıda ve türde hastalıklara neden olur. İskeminin şiddetine ve devam ettiği süreye bağlı olarak meydana gelen kimyasal reaksiyonların sonucunda; disfonksiyon, enerji depolarının kısmen veya tamamen boşalması, toksik metabolitlerin birikmesi ve bunların sonucunda da hücrelerde nekroz oluşabilmesi mümkündür. İskemi sırasında, önceden depolanmış enerji kaynaklarından adenozin trifosfatın (ATP) tüketimi sonucunda, hücre

membranında iyon dengesizliği [özellikle sodyum (Na^+) ve kalsiyum (Ca^{2+}) iyon dengesizliği] sonucu asidoz veya ozmotik şok görülebilir.

Reperfüzyonla iskemiye uğramış dokuda kan akımı yeniden başlatılmakta, toksik maddeler uzaklaştırılmakta ve enerji ihtiyacı yeniden sağlanmaktadır. Ne var ki reperfüzyon sonucunda fonksiyonel düzelme, beklendiği oranda iyi sonuçlar vermemekte ve bu aşamada dokularda oluşan hasar bir süre daha devam edebilmektedir. İskemi durumundayken düşük olan O_2 seviyesi iskeminin süresine bağlı olarak önemli bir hasara sebebiyet vermeyebilir. Ancak reperfüzyon ile O_2 'in kan akımına katılması ve kandaki seviyesinin normale dönmesi sırasında serbest radikaller oluşur. Serbest radikallerin antioksidan kapasiteyi aşacak düzeyde üretilmesi, lokal ve sistemik olarak ciddi boyutlarda hasar meydana getirir. Böylece iskemi-reperfüzyon (İ-R) hasarı denilen bu hasarın meydana gelmesiyle hasara karşı duyarlı olan yapılar bu durumdan daha çok etkilenirler. Hasara karşı en fazla duyarlı olan yapılar ise genel olarak hücrel olan membran lipitleri, proteinler ve nükleik asitlerdir.

Serbest radikallerin aşırı üretimi genel olarak; enerji yetersizliğine, iyon dengelerinin bozulmasına, ayrıca lipitler, proteinler ve deoksiribonükleik asit(DNA)'lerde hasar meydana gelmesine sebep olur.

Organizma İ-R sonrası oluşan serbest radikallere karşı savunma yolları geliştirmiştir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için antioksidanlar üretilmektedir. Bunlar serbest radikalleri nötralize eder. Serbest radikallerin oluşumu ile antioksidanların nötralize etme hızı arasında denge vardır. Hücrede bu denge bozulduğu takdirde serbest radikallerde artış meydana gelir. Dengenin bozulmasıyla birlikte oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres; İ-R hasarı başta olmak üzere dejeneratif, nörodejeneratif, kalp-damar, cerebral-damar ve diğer damar hastalıkları gibi farklı patolojik durumların ortaya çıkması nedeniyle çağımızda gittikçe önem kazanmaktadır.

Metabolik olarak vücudun en aktif organlarından birisi olan cerebrum, mental ve motor fonksiyonların oluşmasında temel ve fonksiyonel bir önem arz etmektedir. Cerebral kan akımının düzenlenmesinde CO_2 , O_2 ve hidrojen (H^+) iyonlarının konsantrasyonu rol oynamaktadır. Ancak cerebrum içerisindeki total kan akımı değişik koşullarda bile oldukça sabittir.

Cerebral iskemi ise, cerebrumun bir bölgesi veya tümünde kan akımında oluşan azalma veya durma olarak tanımlanır. Cerebral iskemi, bilateral veya çalışmamızda olduğu gibi sıklıkla tek taraflı arteria (a). carotis communis, a. cerebri media veya a. carotis interna'nın tıkanmasıyla bağlantılıdır. Cerebral iskemi uzun süreli olursa meydana gelen hasar geriye dönüşümsüz olduğu gibi fonksiyon ve canlılığını yitiren hücrelerde nekroz meydana gelir. Cerebruma giden kan akımı 6-8 dakika (dk) süreyle kesildiğinde, iskemiye hassas olan alanlarda oluşan hasar kalıcıdır.

Damarlardan birinin tıkanması hâlinde oluşan kalıcı nitelikteki hasar günler hatta aylar sürebilir. Bu durum söz konusu damarla beslenen alanlardaki kan akımının aynı ölçüde ve benzer şekilde azalmadığını işaret etmektedir. Cerebrum dokusundaki kan akımının %20'den daha çok azalma göstermesi hâlinde cerebrum dokusundaki ATP hızla tükenir. Bunu anoksik depolarizasyon dalgalarının ortaya çıkması takip eder ve böylece hücre içi kalsiyum (Ca) miktarı çoğalır. Mitokondriyumlarda şişme ve fonksiyon bozukluğuna yol açmak suretiyle hücrenin enerji kaynağında bozulmalar başlar. Tüm bu olaylar sonucunda oluşan serbest radikaller türlü yol ve yöntemlerle hem apoptotik/programlı hücre ölümü hem de nekrotik hücre ölümü meydana gelmesine sebebiyet verirler.

Cerebral iskemi sonucunda oluşan hastalıklar, günümüzde oldukça yaygın, sosyal ve ekonomik sorunlara yol açan serebrovasküler hastalıklardandır. Ülkemizde yapılan istatistiksel verilerin sonuçları da bunu kanıtlamıştır. Ülkemizde olduğu gibi dünyada da kalp hastalıkları ve kanserden sonra gelen üçüncü ölüm nedenidir.

Sağlık Bakanlığı'nın Dünya Sağlık Örgütü verilerinden yaptığı alıntıya göre: Bulaşıcı Olmayan Hastalıklar (BOH) için 40-69 yaş arasındaki nüfusun %10,5'inin 10 yıllık kalp damar hastalığı riski taşıdığı veya hâlen kalp damar hastası olduğu bildirilmiştir.

Bunun üzerine serbest radikalleri nötralize eden antioksidanlar konusunda çok yönlü araştırmalar giderek artmaktadır. Konuyla ilgili gerçekleştirilen araştırmalar daha çok insanlarda antioksidan kapasitenin nasıl artırılacağına odaklanmış olduğu gözlenmektedir. Antioksidan kapasiteyi güçlendirmek için endojen antioksidanların aktivitesini arttırmak ya da eksojen antioksidanların etkili kullanımını yaygınlaştırmak gerekmektedir. Dışarıdan alınan antioksidanlar; hücre, doku veya organın dengesini ve döngüsünü sağlıklı hâle getirir.

Çok sayıda geliştirilen deneysel cerebral iskemi modelleri, insandaki cerebral iskemi ve sonuçlarını sağlıklı ve isabetli bir şekilde değerlendirebilmek açısından önem kazanmaktadır.

Yapılan incelemeler göstermektedir ki geliştirilen modeller, cerebrumda oluşan hasarın patofizyolojisini bilimsel olarak analiz etmemizde, ayrıca bunların yanında yeni tedavilerin geliştirilmesine imkân verecek esnekliktedir. Cerebral iskemi ile ilgili çalışmalar ancak, deney hayvanlarının uzun süre hayatta kalması ve reperfüzyon süresinin iskeminin tam gelişmesine izin verecek kadar uzun olması durumunda anlamlı sonuçlar verebilir.

Astaksantin (ASX) doğal pigmentlerin önde gelen gruplarından olan karotenoidler grubundandır. Çok güçlü bir antioksidan etkiye sahip olan ASX kan-serebral bariyerinden hiçbir engele takılmadan geçtiği için serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı cerebrum ve sinirleri korur.

Öncelikle Alzheimer, Parkinson, Şizofreni, Multiple Skleroz (MS) hastalığının ortaya çıkmasına, eğer bu hastalıklar varsa ilerlemesine mani olur. Bunun yanında kan-göz retinası bariyerini engele takılmadan geçer. Böylece gözde oluşan serbest radikallere engel olarak meydana gelebilecek her türlü yapısal tahribatı engeller. Ayrıca kanser, deri ve kalp hastalıklarının tedavisinde etkin olarak kullanılır.

Yaptığımız çalışmada deneysel iskemi modellerinden biri olan a. carotis communis İ-R modeli oluşturularak, ASX'in antioksidan sistem ve beyin üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.



2- GENEL BİLGİLER

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2017 yılı ölümlerin birinci sırasında dolaşım sisteminden kaynaklanan hastalıkların, bunların alt bölümlerinde ise ilk sırada iskemik kalp, ikinci sırada serebro-vasküler hastalıklarının yer aldığını bildirmiştir (104). Bu hastalıkların tanı ve tedavisinde damarların bilinmesi önem taşımaktadır. Bu veriler, yaptığımız türden çalışmalara insanlığın ve ülkemizin ne ölçüde ihtiyaç duyacağını göstermektedir.

2.1-Cerebrum'un Vasküler Anatomisi

Çalışmamızda ACC'den geçen kan akımının azalması veya tamamen kesilmesinin beyin üzerindeki etkisi ile ASX'in antioksidan sistem ve beyin üzerindeki koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle ACC'nin hangi dallara ayrıldığı ve bu dalların beynin hangi bölgelerini beslediği konusu önem kazanmaktadır.

Yaklaşık 6-12 milyar sinir hücresi taşıyan encephalon; cerebrum, diencephalon, truncus encephali (beyin sapı) ve cerebellum (beyincik) olmak üzere dört bölümden oluşur. Cerebrum; bir adet fissura longitudinalis ile iki adet hemispherium cerebri'ye (beyin yarımküresi) ayrılır.

Her bir hemispherium cerebri (beyin yarımküresi); cortex cerebri (beyin kabuğu), substantia alba (beyaz cevher), pars basalis telencephali (bazal ön beyin) ve nuclei basales'i (bazal çekirdekler) içerir. Ayrıca her bir hemispherium cerebri'de lobus frontalis, lobus parietalis, lobus occipitalis ve lobus temporalis bulunur. ACC'in uç dallarından biri olan a. carotis interna (ACI) ve iki taraf a. vertebralis'in birleşmesinden oluşan a. basilaris, cerebrum'un beslenmesini sağlar. Lobus occipitalis dışında kalan hemispherium cerebri'lerin beslenmesini ACI dalları sağlar.

2.1.1- Aorta

Aorta, sistematik dolaşımın ana damarıdır. Aorta ascendens, arcus aortae ve aorta descendens denen üç ayrı bölümü vardır.

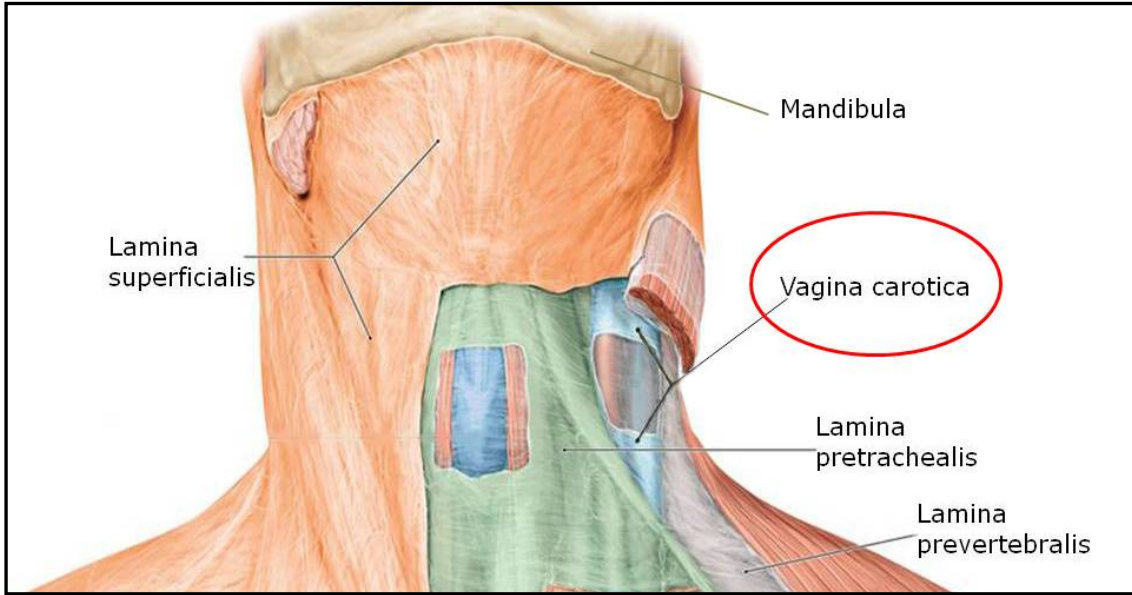
2.1.1.1- Arcus aortae

Sağ 2. sternokostal eklemin üst kenarı seviyesinde, manubrium sterni'nin sağ yarımının arkasında, aorta ascendens'in devamı olarak başlar. Arcus aortae'dan soldan sağa doğru; a. subclavia sinistra, a. carotis communis sinistra ve truncus brachiocephalicus olmak üzere üç dal çıkar.

2.1.1.1.1- A. carotis communis

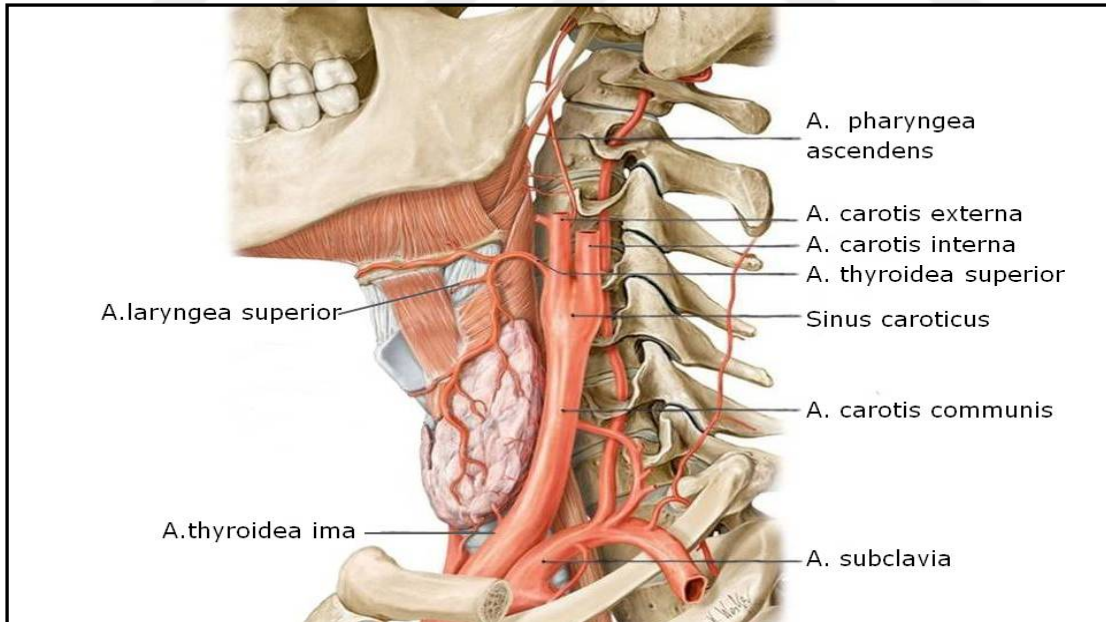
Baş ve boynu besleyen ana arterdir. ACC dextra truncus brachiocephalicus'tan, ACC sinistra ise T3-T4 arası diskus seviyesinde

arcus aortae'dan direkt çıkar. ACC'lerin servikal parçaları benzer seyir gösterir. Vagina carotica içerisinde yer alır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Vagina carotica ve içerisinde yer alan yapılar

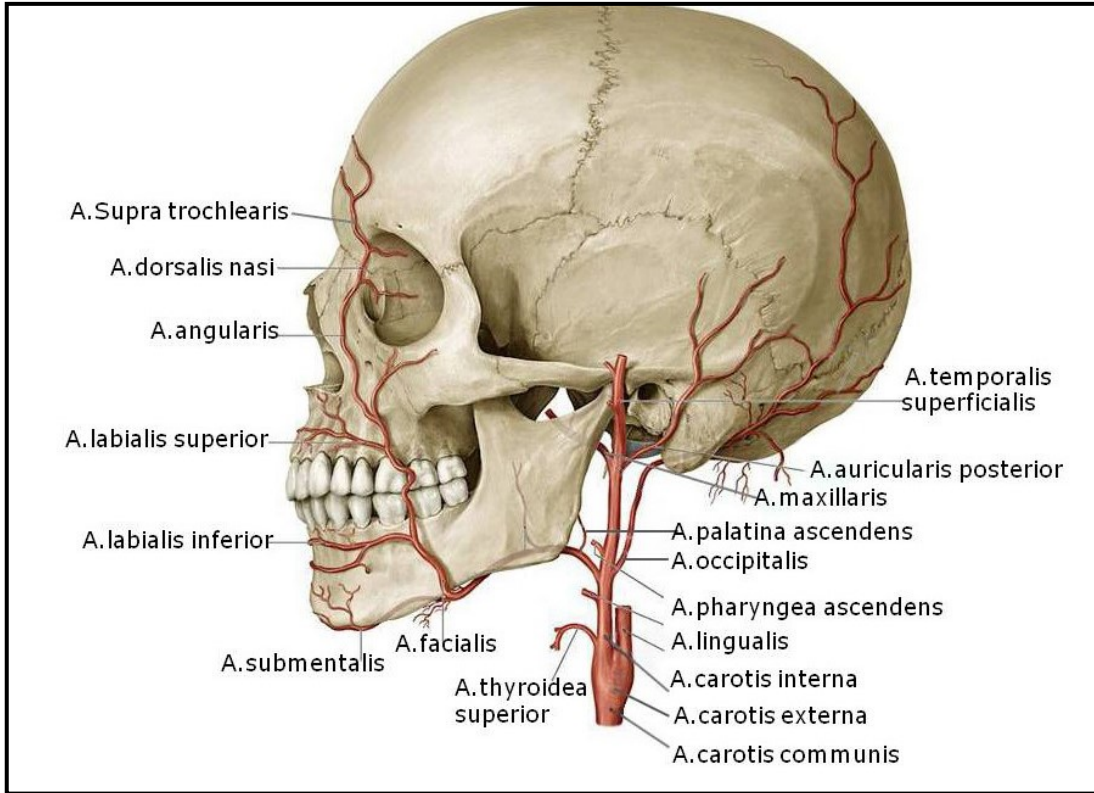
ACC servikalde cartilago thyroidea'nın üst sınırına (C3-C4 arası diskus, bifurcatio carotica) yakın bölgede beyne giden ACI ve yüze giden a. carotis externa (ACE) olmak üzere iki kola ayrılır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 A. carotis communis'in boynundaki seyri

ACE baş ve yüzü besleyen temel arterdir. Seyri sırasında dallar verir (Şekil 2.3). A. thyroidea superior dalı, komşu kasları ile glandula thyroidea'yı besler. A. pharyngea ascendens dalı pharynx ve orta kulak boşluğu iç duvarını besler. A. lingualis dalı dilin esas arteridir. A. occipitalis dalı temporal kemiğin processus mastoideus'una komşu olan sulcus a.

occipitalis'ten geçip vertexe kadar scalp'ı besler. A. auricularis posterior dalı orta kulak boşluğunu, antrum mastoideum'u ve denge ile ilgili olan canalis semicircularis'leri besler. A. facialis dalı ise palatum molle, üst ve alt dudak, glandula submandibularis, dilin arka bölümü, çenenin alt bölümü, burun sırtı ve burun kanadını besler (86).

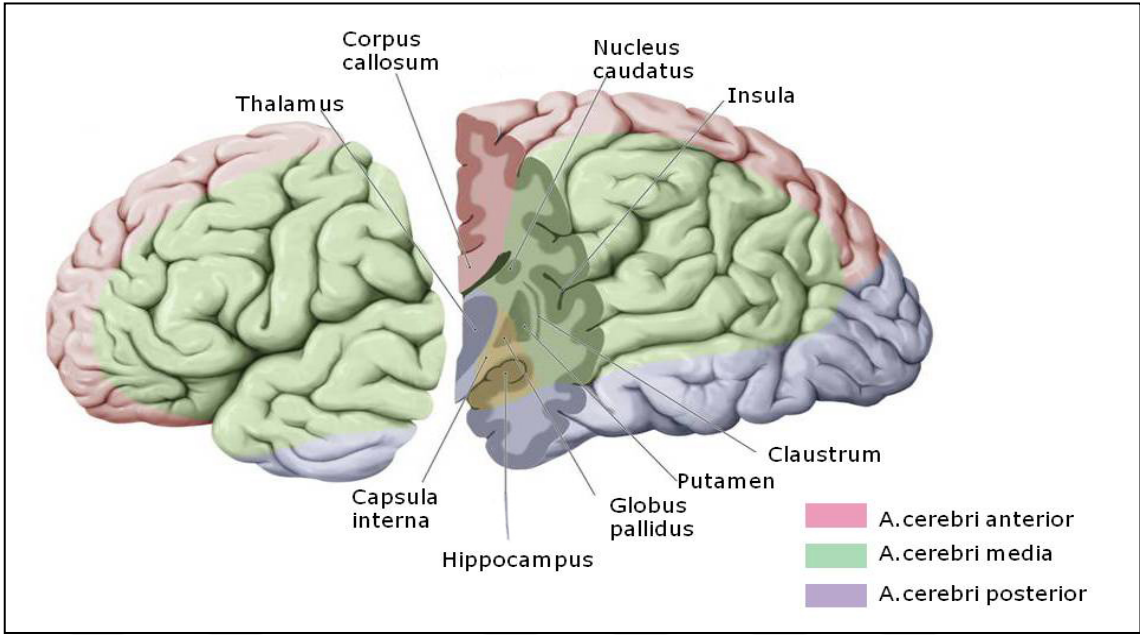


Şekil 2.3 A. carotis externa ve dalları

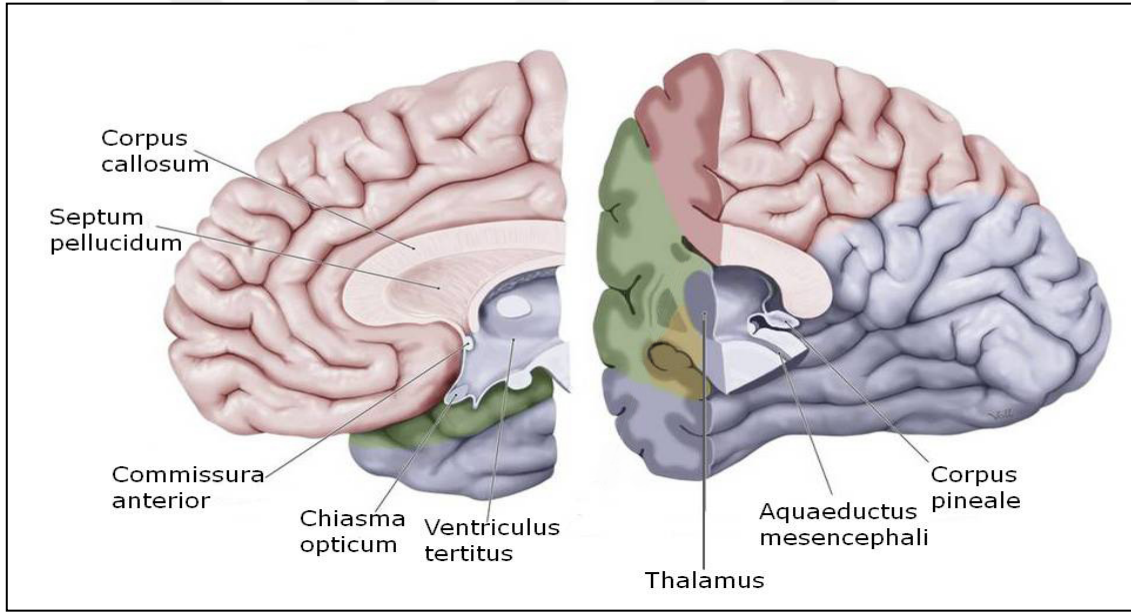
ACI cerebrumu besleyen iki damardan biridir. Servikal bölgede dal vermeden geçerek os temporale'deki canalis caroticus'a girer. Canalis caroticus'tan çıktıktan sonra sinüs cavernosus'a doğru ilerleyip içerisine girer. Daha sonra substantia perforata anterior'un altında uç dallarına ayrılır. A. ophthalmica dalı orbita'da bulunan yapıları ve bulbus oculi'yi besler (86).

Sırasıyla a. communicans posterior ve a. choroidea anterior'u verir. A. communicans posterior üçüncü ventrikül duvarını, hypothalamus'un ve thalamus'un medialini besler. A. choroide anterior; nuclei basales, mesencephalon, hypothalamus, hippocampus, corpus amygdaloideum ve capsula interna'yı besler.

ACI; a. cerebri anterior ve a. cerebri media diye adlandırılan iki dalına ayrılarak sonlanır. A. cerebri media, hemispherium cerebri'lerin lateral (Şekil 2.4) ve medial yüzlerini besler (Şekil 2.5).



Şekil 2.4 Hemispherium cerebri'nin lateral yüzeyinden görüntü



Şekil 2.5 Hemispherium cerebri'nin medial yüzeyinin beslenmesi

A. cerebri media'nın ana trunkusundan a. centrales anterolaterales (lentikülostriat arterler) çıkar. Bu dallar capsula interna'yı ve nuclei basales'leri besler (Şekil 2.5). Kortikal dallar ise primer oditör korteksi, Wernicke alanını, Broca alanını, radiatio optica'yı, vizüel kortikal alanı ve majör assosiasyon alanlarını besler (Şekil 2.4).

A. cerebri anterior lobus frontalis, lobus parietalis ve lobus temporalis içeren hemispherium cerebri'nin medial yüzünü besler. Hemispherium'un iç yüzünde fissura longitudinalis superior'a komşu olarak arkaya doğru seyrederek. A. communicans anterior dalı chiasma opticum, hypothalamus, fornix ve gyrus cinguli'yi besler. A. cerebri anterior'dan ayrılan perforan

(santral) dallar nuclei basales, capsula interna ile corpus callosum'un ön bölümünü besler (Şekil 2.5). Kontralateral bacak ve ayağın motor ve duysal kortikal alanları ile perineum'un temsil edildiği alanları a. cerebri anterior'dan ayrılan kortikal dallar besler (Şekil 2.4).

A. cerebri anterior'un supraorbital dalından gelen kan, ACI'yı doldurmak için a. ophthalmica boyunca geriye doğru akabilir. Ayrıca a. cerebri anterior'un meningeal dalları cerebral arterlerin distal dalları ile anastomoz yapabilir.

2.2- İskemi

Doku ya da organa gelen kan akımının (arteriyel ya da venöz) çeşitli nedenlerle azalması ya da durması/kesilmesi sonucu hayati fonksiyonların sürdürülebilecek düzeyde olmaması durumuna iskemi denir (112). İskemi sonucunda geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz doku ve organ hasarı meydana gelir (103).

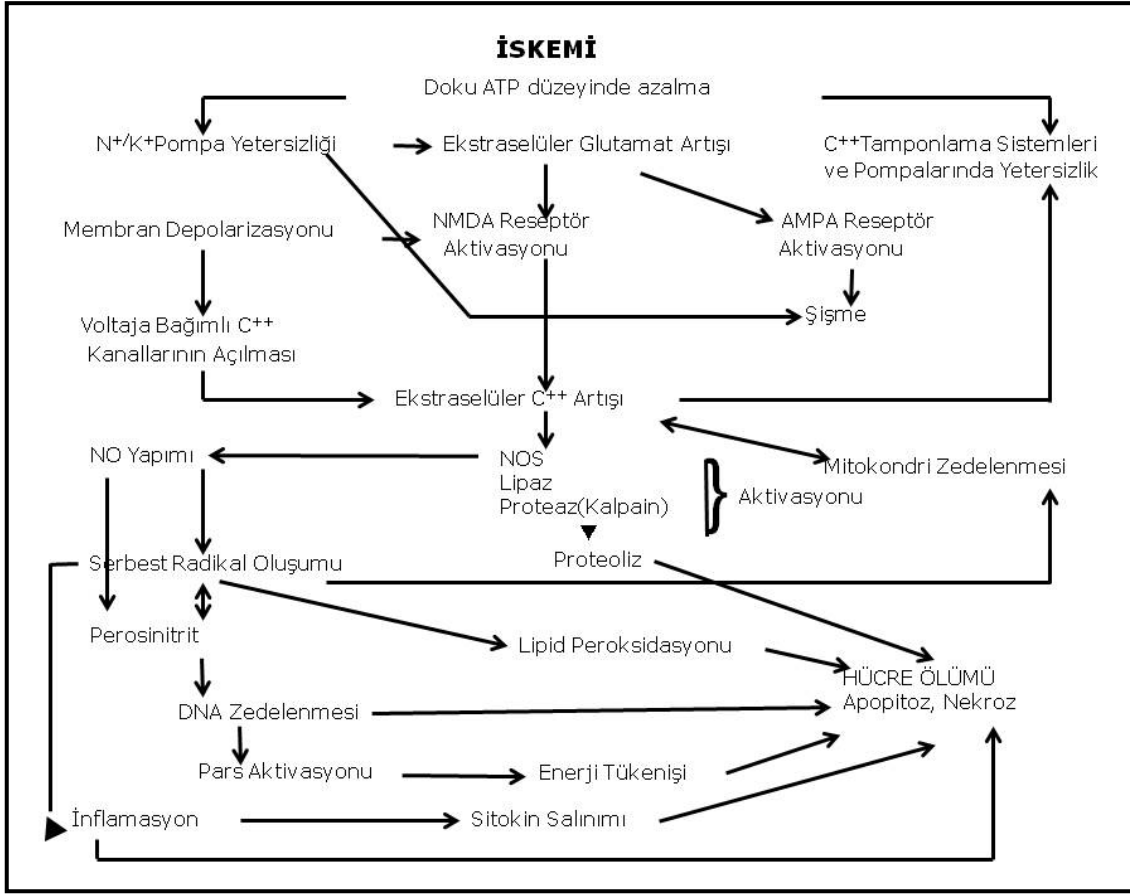
Hücreler işlevlerini yerine getirebilmek için O_2 'e ihtiyaç duyar. Oysa iskemiye uğrayan doku ya da organa ait hücreler yeterli miktarda O_2 alamaz. Bu durum, fonksiyon bozukluğu (disfonksiyon) ile başlayıp hücrenin ölümüne kadar gidebilen birçok kimyasal olaylara neden olur (33,45,90). İskemi sırasında hücre içi O_2 azalması nedeniyle mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellendiği için hücrede anaerobik solunum (oksijensiz solunum) başlar. Böylece ATP ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfatların sentezi azalır ya da sona erer (51,100). ATP'nin tüketimi sonucu hücre membranında iyon dengesizliği meydana gelir (33,55,64,95).

Hücre membranında bulunan ve hücre canlılığının devamı için hayati önemi olan Na^+/K^+ -ATPaz pompası inhibe olur. Böylece ekstrasellüler ortama potasyum iyonu (K^+) çıkarken intrasellüler Na^+ ve Ca^{2+} oranları yükselir. İntراسellüler Ca^{2+} oranının yükselmesi birçok enzim sistemini aktive ederek ciddi düzeyde oksidatif strese neden olur (40). Özellikle Na^+ ve Ca^{2+} dengesindeki bozulma sonucu asidoz veya ozmotik şok görülebilir (64,95) (Şekil 2.6).

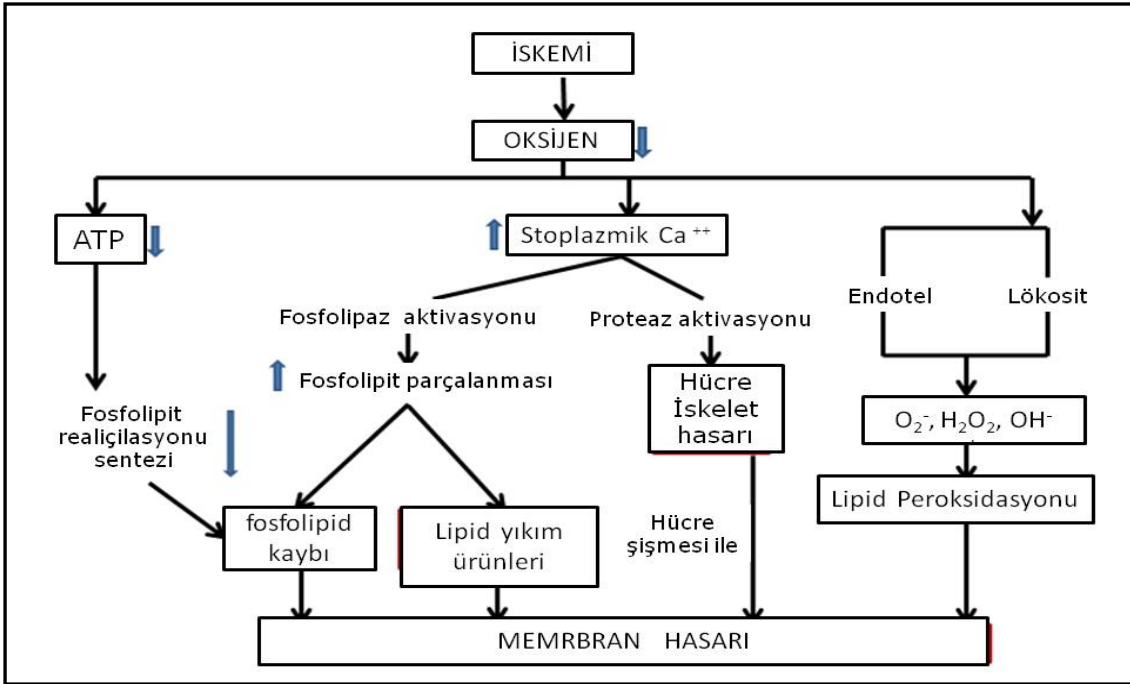
Ekstrasellüler ve intrasellüler Ca^{2+} konsantrasyonunu dengeleyen diğer bir pompa ise ATP'a bağlı olarak çalışır. İntراسellüler Ca^{2+} oranında yükseliş ile proteolitik enzimler ve fosfolipazlar aktive olur. Aktive olan proteazlar hücre çatısına zarar verebilir. Bunun sonucunda hücre iskelet anormallikleri ortaya çıkabilir. Ayrıca Ca^{2+} artışı ile endojen fosfolipazların aktivasyonu membran fosfolipidlerinin yıkımının artmasına ve araşidonik asit oluşumuna yol açabilir.

Membranlar üzerinde fosfolipidlerin parçalanmasıyla iskemik hücrelerde biriken lipid yıkım ürünleri hasar oluşturur. Araşidonik asit doğrudan mitokondriyal enzimleri baskılar ve serbest radikal üretimini

arttırır (57). İyon dengesinin bozulması ile pro-inflamatuar sitokinlerin ve lökosit adezyon moleküllerinin yapımında artış olur (100) (Şekil 2.7).



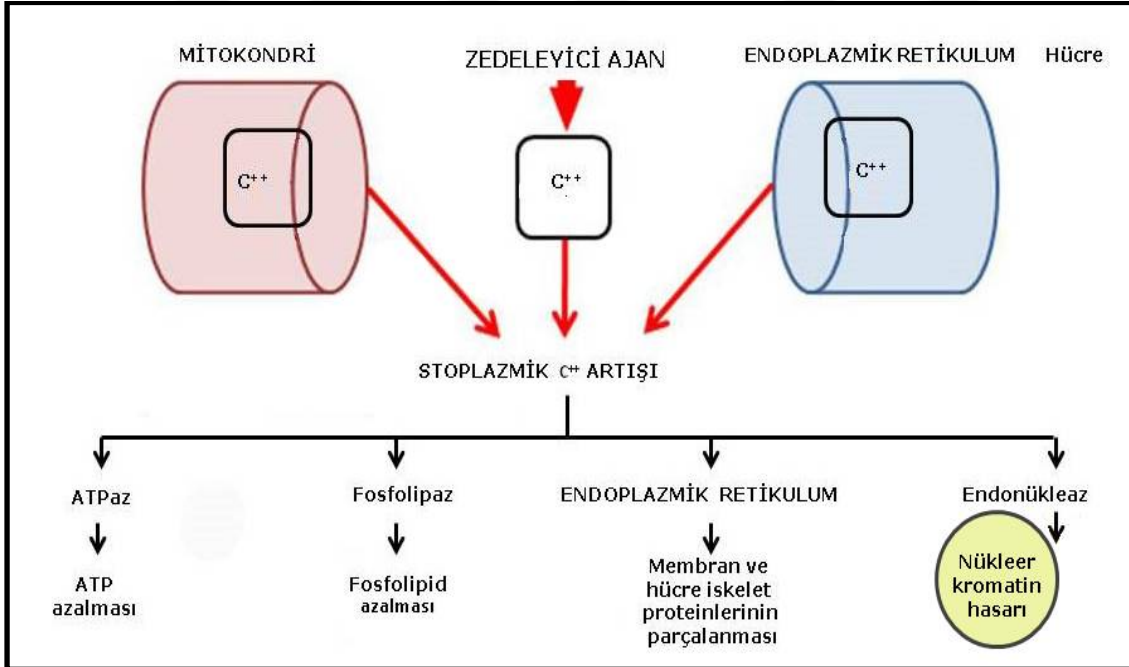
Şekil 2.6 İskemi oluşum mekanizmasının şematik olarak tarifi (58)



Şekil 2.7 Membran hasar mekanizması (99)

Anaerobik metabolizma sonucu glikojen hazneleri hızla tükenir. Glikolizde, laktik asit türevleri ile fosfat türevlerinin hidrolizi ile organik olmayan fosfatların toplanmasına, bu da intrasellüler pH'nin düşmesine sebep olur. Laktik asit artışıyla oluşan asidoz, yüksek enerjili bağların azalmasına ve hücrede enerji yetersizliğine sebep olur (8,9).

İskemi boyunca ATP oluşumu kısıtlı olsa da etkinliğinin sürmesi için enerji tüketimi devam eder. Enerji üretimi birbirini takip eden basamaklardan oluşur. İlk basamak ATP, adenosin difosfat (ADP)'a sonra adenosine indirgenir. Bunu takiben adenosin, inosine sonra da hipoksantine dönüşür. Hipoksantin O_2 'li ortamda ürik aside dönüştürülerek dışarı atılır. İskemi nedeniyle hipoksantin ürik aside dönüşümünü gerçekleştiren ksantin oksidaz (KO) yetersiz kaldığından dolayı, hipoksantin birikimine yol açar (74). Bu reaksiyonda elektron alıcı olarak O_2 kullanıldığından oluşan oksijen radikalleri oksidatif hasarda artışa sebep olur (100). Sitotoksik olaylar ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılmasına neden olur. Ayrıca zar geçirgenliği artar ve hücre yüzeyinde tomurcuklanmalar başlar. Polizomlar monozomlara parçalanır, protein sentezi azalır ve endoplazmik retikulumun genişlemesiyle tüm hücrede şişme görülür. Bu aşamadan sonra O_2 verilinceye kadar geçen zaman içinde oluşan zedelenmeler geri dönüşümlü, iskemi hâlâ devam ederse geri dönüşümsüzdür (57, 117) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Endoplazmik retikulum ve mitokondride meydana gelen değişiklikler (99)

2.3- Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemiye uğramış doku ya da organda kan akımının yeniden başlamasıdır. Yeniden kan akımının başlamasıyla doku ya da

organda normal fonksiyonlar eski hâline gelmekte, ancak reperfüzyon sırasında da ona bağlı olarak ayrı bir hasar oluşmaktadır (5,83,101,117). Organlarda oluşan iskemi sonrası reperfüzyon daha fazla hücrenel nekroz riskine sebep olacağından dolayı, fonksiyonların geri dönüşümünü sınırlandıracaktır. Reperfüzyon hasarında birçok madde ve biyokimyasal reaksiyonlar rol oynamaktadır. Bu reaksiyonlarda maddelerin etkileşimi sonucunda serbest radikaller ortaya çıkar (46). İskemi süresine bağlı olarak oluşan serbest radikaller de dokuya hasar verir. Ancak reperfüzyon sırasında daha fazla miktarda oluşan serbest radikaller doku hasarını artırır (11,64). Yani reperfüzyon, hücre rejenerasyonunu ve toksik metabolitlerin temizlenmesini sağlarken aynı zamanda ciddi bir hasara da yol açar (119).

Membran lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve DNA molekülleri reperfüzyon hasarına en fazla hassas olan yapılardır (111). İ-R hasarının oluşum süreci ile ilgili farklı mekanizmalar ve etkenler öne sürülmektedir (35). Reperfüzyon sırasında zedelenme alanına yerleşen polimorf nükleer lökositlerin (PMNL) dokudaki yıkımı artırıcı etki yaptığı bildirilmiştir. Reperfüzyonda O₂ düzeyinin eski haline dönmesiyle iskemi bölgesinde KO etkisi ile fazla miktarda hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit radikali (O₂⁻) üretimi artar.

İ-R süresi boyunca; enerji yetersizliği, dengede olan iyon oranının bozulması, intrasellüler asidoz ve fosfolipid döngüsü için gerekli reaksiyonlarda değişiklik, serbest yağ asitleri ve serbest radikallerin üretiminde artış gibi bazı kimyasal değişiklikler gözlenir (110,114).

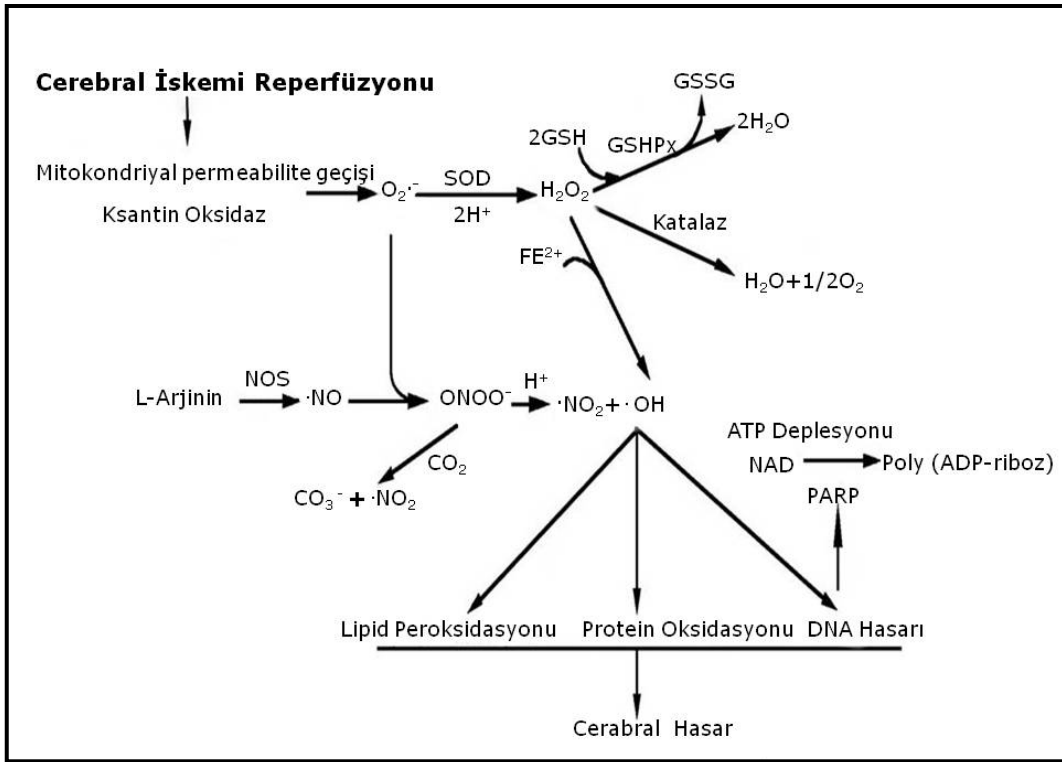
Reperfüzyonun başlangıç döneminde, endotel hücrelerde O₂⁻ oluşumu artarken, nitrik oksit (NO) üretimi azalır. O₂⁻ ile NO arasındaki dengenin bozulması, bazı inflamatuvar maddelerin salınmasına ve adezyon moleküllerinin (lökosit-endotel hücre adezyon aracısı) biyosentezinin artmasına neden olur (100). Reperfüzyon sırasında ise nötrofil aktivasyonu ve kemotaksi meydana gelir. Nötrofiller; nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini içerir. Bunlar serbest radikallerin oluşumunda, İ-R ve oksidatif doku hasarında rol oynar. Nötrofillerin aktivasyonu ile proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olur (55).

2.4-Cerebral İskemi

Cerebral iskemi, cerebrum'un belli bir bölgesinde ya da tamamında yeterli miktarda kan akımının sağlanamaması hâlidir. Cerebral dokuda normal cerebral kan akışı dakikada 50–75ml/100g iken, 18ml/100g düzeyine düşerse iskemi meydana gelir. Bunu takiben nöronların enerji kaynağı olan O₂ ve glikoz tükenir. Cerebral dokuda enerji kaynaklarının azalmasıyla beslenme de azalırsa hücre fonksiyonunda geri dönüşümsüz hasar meydana gelir (105).

Cerebrum'da öncelikle hippocampus CA1 bölgesi, corpus striatum, motor korteks piramidal nöronlar, cerebellum purkinje hücreleri diğer bölgelere oranla daha fazla etkilenmektedir (56). İskemide nöronal fonksiyonu etkileyen ana etken ATP azalmasıdır. İskemi sürecinde ATP yoksunluğu, ATP-bağımlı iyon pompalarını inaktive ederek membran depolarizasyonuna neden olmakta, hücre içi ve dışı iyon dengesini bozmaktadır.

Ca^{2+} 'nın ekstrasellüler ortamdan intrasellüler ortama geçmesiyle hipoksantin ve ksantin hücre içinde çoğalır. Bu da hücre içindeki proteazlar ve lipazları aktive ederek cerebral doku hasarını başlatır (65). Proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin sentezi durur (Şekil 2.9). Tüm bu süreçlerin sonunda serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşur.



Şekil 2.9 Cerebral İskemi Reperfüzyon mekanizması şematik gösterimi

Kan akımı total olarak kesilirse 10-20 saniye(sn) arasında cerebrum'un elektriksel aktivitesi kaybolur. 30 sn içerisinde Na^+-K^+ pompası bozulur ve glikoz seviyesi süratle düşer. İskemiyle 3 dk içinde Na^+ 'nın hücre içine geçişini, suyun pasif olarak hücre içine girişi takip eder ve intrasellüler ödem oluşur. 5 ile 10 dk arasında intrasellüler laktat seviyesi yükselir ve hücresel glikoz tükenir. İskemi devam ederse hücre organellerinde gittikçe ilerleyen ve geri dönüşümsüz değişiklikler olur (102). Reperfüzyon, cerebral kan akışını düzeltirken; nötrofil göçü, serbest radikallerde artış ve cerebral ödem gibi yollarla cerebral hasara neden olur. Serbest radikallerde artış, oksidasyonu ve hücre ölümünü tetikleyen diğer yollarla birlikte intrasellüler proteinlerde ve DNA'da hasara yol açar

(43).

İskemik hücre ölümünün gecikmeli olması en önemli özelliğidir. Gecikme, iskeminin etkisine ve etkilenen cerebrum bölgesine göre değişkenlik gösterir. Gecikmiş nöron ölümü, genelde birkaç saat ya da daha az; bazı zamanlarda ise günlerce, hatta haftalarca sürebilir (23,53,72). İ-R'da programlanmış hücre ölümü diye tanımlanan apoptozis, organizmanın hücreleri yok etmekte kullandığı biyomoleküler bir süreçtir. Komşu hücreler için tehdit oluşturan enfekte hücreler, genetik hasara sahip hücreler, yaşlanmış immün hücreler veya İ-R'de olduğu gibi strese maruz kalan hücreler apoptozise yol açmaktadır (68).

Nöronun aşırı aktivasyonu intrasellüler iyon dengesini bozar, aşırı Ca^{+2} birikimi ve eksitotoksik hücre nekrozu oluşur (18,92,98). Sonuç olarak; cerebrum'un vasküler yapıları ve parankim dokusu İ-R hasarına uğrar. İskemide en sık görülen hücrelerin büzüşmesi ve elektron bakımından aşırı yoğun bir hal almasıdır. Daha ender görüleni ise, hücrelerin şişmesi ve organellerin şekillerini yitirmesidir (66).

2.5-Cerebral İskemi Modelleri

Genellikle bilinen Cerebral İskemi Modelleri ikiye ayrılır. Bunlar: Global Cerebral İskemi ve Fokal Cerebral İskemi modelleridir. Ancak 1980'li yılların başlarında ilk kez üçüncü bir model olarak Ön Cerebral İskemi Modeli de bildirilmiştir (57).

2.5.1-Fokal Cerebral İskemi

Fokal cerebral iskemi, cerebrum'un belli bir bölgesindeki kan akışının azalması diye tanımlanır. Fokal cerebral iskeminin çoğu modeli a. cerebri media'nın oklüzyonu ile kendini gösterirken iskemik çekirdek ve iskemik penumbra bölgeleri oluşur. İskemik çekirdek cerebral kan akışının ciddi derecede azaldığı (iskemik) odak bölgedir. İskemik penumbra ise iskemik çekirdeğin daha distalinde bulunan ve kollateral damarlar ile az da olsa beslenmeye devam eden cerebrum dokusudur. İskemik çekirdekte majör olarak nekrotik nöronlar bulunurken, penumbrada apoptotik nöronların daha fazla olduğu belirlenmiştir (43).

Global cerebral iskekiye göre çekirdek bölgesinde bile kan akışı oldukça fazladır. Bu nedenle fokal cerebral iskemi modellerinde cerebral hasarın oluşabilmesi için iskemi süresi, global iskemi modellerine göre daha uzundur. Fokal cerebral iskemide lezyon farklı metabolik koşullar sebebiyle çekirdekten penumbranın distal sınırına kadar belirgin farklılıklar göstermektedir. Sonuç olarak, uygulama süresi ve lezyon heterojenliği açısından fokal iskemi global cerebral iskemi modelinden çok daha karmaşık bir yapıya sahiptir (66).

Kalıcı ve geçici olmak üzere iki fokal cerebral iskemi modeli vardır. Kalıcı iskemi modelinde iskemik hasar alanı meydana gelir ve dejeneratif değişiklikler daha geniş alanlara dağılır (39). Kemik ve cerebral parankim dokusu hasarı olmadığı için deneysel çalışmalarda en çok tercih edilen modeldir (67).

2.5.2-Global Cerebral İskemi

Global cerebral iskemi, cerebrum'un tamamında kan akışının azalması ya da kesilmesi olarak tanımlanır. Kemirgenlerde global cerebral iskemi dört damar oklüzyonu veya iki damar oklüzyonu teknikleriyle oluşturulmaktadır.

Dört damar oklüzyonu tekniğinde: a. vertebralis'lerin elektrokoagülasyonundan hemen sonra veya 24 saat sonra ACC geçici olarak oklüde edilmektedir. İki damar oklüzyonu tekniğinde ise: ACC'nin geçici oklüzyonunun yanı sıra, arterial kan basıncının 40-50 mmHg düzeyine düşürülmesi sağlanır.

Gerbillerde a. communis posterior'lar gelişmediğinden, global cerebral iskemi oluştururken sadece ACC oklüde edilir. Her iki modelde de ön cerebralin yapılarında ileri derecede iskemi oluşmaktadır (43, 66).

Geçici global cerebral iskemi modellerinde şiddetli sistemik hipotansiyon sonucunda geçici nöronal hasar görülmektedir. Aynı zamanda cerebral dokudaki hippocampal nöronlarda sitozolik sitokrom c artışı gözlenir. Geçici global cerebral iskeminin kemirgenlerde oluşturulan modellerinde uzaysal öğrenme ve hafıza bozukluğu üzerinde en çok durulan parametrelerdir. Bunun bir sonucu olarak, iskemik cerebral hasarda tedaviye yönelik ilaçların pre-klinik potansiyeli, uzun vadeli fonksiyonel ve davranışsal etkilerine bakılarak belirlenir (25, 109).

2.5.3-Ön Cerebral İskemi

1980'li yılların başlarında ilk kez ön cerebral iskemi uygulanmıştır. Bu model, nadiren görülen bilateral ön cerebral iskeminin klinik durumunu tam olarak yansıtmaz. Bu modelde, ACC'lere klemp takıldıktan sonra deney hayvanından kan alınarak tansiyonun 30-35 mmHg'ye düşürülmesi sağlanır. ACC'lerdeki klemp çıkarılarak reperfüzyon oluşumu sağlanır.

2.6-Deney Hayvanları Olarak Kemirgenlerin Kullanılması

Deney hayvanı olarak daha çok kemirgenler deneysel iskemi modelinde kullanılmaktadır. Maliyetinin düşük olması, cerebral hasarın tutarlı bir biçimde tekrarlanabilmesi, fizyolojik olarak kontrol edilebilmesi ve iskemik cerebral hasarın spesifik mekanizmalarıyla çalışılabilmesi deneylerde kemirgenlerin kullanılmasında tercih sebebi

olmuştur (43,66).

Sıçan, fare, gerbil gibi birçok laboratuvar kemirgen türlerinin deneysel iskemi modeli için yaygın bir şekilde kullanılmasında, yeni terapötik ilaçların test edilmesine olanak vermesinin de etkisi vardır.

Sıçan gibi küçük kemirgenler; cerebral fizyolojilerinin ve vaskülarizasyonlarının insana yakın olması, cerebrum kütlelerinin küçük olması, donmuş kesit alma kolaylığı ve parafine gömme yöntemine elverişli olması gibi sebeplerle de tercih edilmektedir.

2.7-Serbest Radikaller

Serbest radikaller tıp dünyasında son yüzyılın en önemli buluşları arasında hak ettiği yeri almış olup onun sayesinde bilinmeyen nice yolların ortaya çıkacağı ve açılmayan nice kapıların açılacağı kanıtlanmıştır. Serbest radikaller, hastalıklarda ve yaşlanmada önemli oranda etkili oldukları ortaya çıktıktan sonra bilimsel incelemelerin vazgeçilmez alanı olmuştur.

Serbest radikallerin varlığı kimyasal alanda yaklaşık 100 yıl önce bilinmesine rağmen tıp dünyasında 20. yüzyılın ikinci yarısından sonra önemi fark edilmiştir. Günümüzde her hastalık bir aşamaya kadar oksidatif strese bağlıdır. Sağlıklı doku hücrelerinde, serbest radikallerin hasar oluşturmayacak seviyede kalmasını sağlamak için yoğun bir denetim yapılmaktadır (106).

Serbest radikallere, doku hasarına ve hastalıklara yol açan bir tür biyokimyasal ajan olarak bakılmıştır. Tarihsel süreçte; radikal ile serbest radikal terimleri birbirleri yerine ve radikal terimi ise serbest radikalın su molekülleri tarafından tutulmuş şekli için kullanılmaktaydı.

Serbest radikaller, dış orbitallerinde eşleşmemiş/ortaklanmamış elektron bulundukları için reaktif olan, kısa ömürlü atom ya da moleküller olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller negatif yüklü (anyon) ve pozitif (katyon) yüklü olabildikleri gibi elektriksel olarak yüksüz de olabilirler (99).

Yaşamak için havanın oksijenini harcamak zorundayız. Harcamak zorunda olduğumuz O_2 ise paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahiptir ve metabolik olaylar sırasında bazı ara ürünlere dönüştürülür. Demir (Fe^{3+}), Bakır (Cu^{2+}), Manganez (Mn^{2+}) ve Molibden (Mo^{5+}) gibi geçiş elementleri ortaklanmamış elektronlara sahip olmasına rağmen serbest radikallerden sayılmazlar ama serbest radikal üretiminde önemli rol oynarlar.

O_2 tüketimimizin %90'ından fazlası elektron transport zinciri reaksiyonlarından sorumludur. Geri kalan %10 O_2 tüketimimiz ise O_2

gerektiren diğer reaksiyonlardan sorumludur. Bunlar özellikle amino asitlerin katabolizması/yıkımı ile ilaçların toksinlerden arındırılması, ayrıca steroid hormonların sentezi gibi özellikli metabolik yollar için önem kazanmaktadır. Enerji üretimi için kullanılan O_2 , reaktif oksijen türleri (ROT, ROS) ya da reaktif nitrojen türleri (RNT) üretimine de neden olur.

Hücrelerde metabolik reaksiyonlar için ihtiyaç duyulan O_2 'nin %90'ı mitokondride oksidatif fosforilasyon sırasında kullanılır ve ROS'a dönüştürülür (77).

Üretilen serbest radikaller membran lipitlerinin, intrasellüler proteinlerin ve nükleik asitlerin yapı ve fonksiyonlarını değiştirerek hücresel hasar meydana getirmektedir. Serbest radikaller stabil olmayan reaktiviteleri çok yüksek moleküllerdir. Diğer moleküllerden elektron tutmaya çalışırlar. Serbest radikaller sahip oldukları eşleşmemiş elektronlarından dolayı öteki maddelerle zahmetsizce reaksiyona girebilirler. Çift elektrona sahip atomlar genellikle kararlı yapıda olup başka atomlarla reaksiyona girme temayülünde değildirler. Kararlı yapıları olan, eşleşmemiş elektronu içermeyen ve diğer maddelerle serbest radikaller ölçüsünde reaksiyona girmeyenler radikal olarak adlandırılmazlar (42,106).

Ancak geçiş elementleri diye tanımlanan Fe^{+3} , Cu^{+2} , Krom (Cr), Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi elementler eşleşmemiş elektronları olsa da serbest radikal kabul edilmezler. Ancak serbest radikallerin oluşumunda önemli rol oynarlar. Organizmada prooksidan ve antioksidan dengenin antioksidanların etkisizliği/yetersizliğiyle bozulması sonucu oksidatif strese sebep olan serbest radikaller, başta kanser, çoğu hastalığın nedenini oluştururlar.

2.7.1- Serbest Radikallerin Kaynakları

Hücre ve çevresinde sürekli olarak üretilen serbest radikaller oksijen (ROT) veya nitrojen (RNT) kaynaklı olabildiği gibi endojen ve eksojen kaynaklı da olabilir (106).

2.7.1.1-Endojen kaynaklar

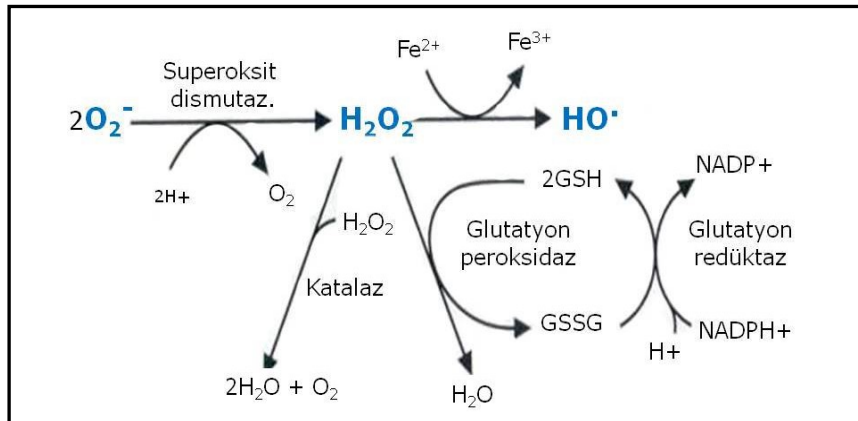
Hücrelerin serbest radikal kaynağı, mitokondriyal elektron transport zincirinde meydana gelen sızıntıdır. Aerobik solunum esnasında yan ürün olarak oluşurlar. Mitokondri endomembranında bulunan oksidatif fosforilasyon zinciri elemanları büyük oranda indirgendiğinde O_2^- oluşumu yükselir. Serbest radikaller O_2 'le hızla reaksiyona girerler. Çoklu yağ asitleri ile fosfolipidler otooksidasyona daha fazla eğilim gösterirler. İlk oluşan ana ürünler olan ROOH'lar (hidroperoksit), birbirleriyle veya oksitlenmemiş diğer maddelerle reaksiyona girerek çeşitli bileşikleri oluştururlar (42,88).

Fagositik hücrelerin uyarılması sonucu aktive olan fosfolipaz ve protein

kinaz hücre zarından araşidonik asit salınımına neden olur. Bu asitler de enzimatik oksidasyonu ile çeşitli serbest radikal ara ürünlerini oluşturur. Bu olaya "enzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Hasara uğramamış dokularda KO, dehidrojenaz şeklinde bulunur ve pürinlerin yıkılım aşamalarında elektron akseptörü olarak çoğunlukla nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) kullanır. Oksijen yetersizliğine bağlı olarak ADP'nin ATP'ye dönüşümündeki azalma sonucu pürin bazı hipoksantine dönüştürülür. İskemi sırasında düşük oksijen seviyesinden dolayı önemli hasar olmaz. Reperfüzyon esnasında normale dönen oksijen seviyesi iskemi alanında fazla miktarda H₂O₂ ve O₂⁻ oluşmasına neden olur ve böylece İ-R hasarı ortaya çıkar. Cerebrum'da ödem, iskemi, damar geçirgenliğinde farklılık gibi oksidatif hasarlara neden olur (61).

Peroksidomlarda yüksek katalaz (CAT) aktivitesinden dolayı sitozole geçen H₂O₂ miktarı belli değildir. Bağışıklık sisteminde yer alan makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerin aktivitesi fagositik solunum patlaması sırasında da çeşitli serbest radikallerin meydana gelmesine neden olur. Nötrofillerin hücre membranında bulunan NADPH oksidaz serbest radikal üretir. Fagosit hücrelerde alınan O₂ miktarının artması sonucu aktive olan NADPH oksidaz, ekstraselüler sıvılardaki süperoksit anyonu miktarını artırır (24).

Fagositlerin uyarılması sonucunda glikoz oksidasyonunda artış olur. Solunum içerikli patlama sırasında da elektron vericisi olan NADPH kullanılır ve O₂'in O₂⁻ iyonuna indirgenmesi sonucu NADP⁺ üretimi artar ve heksoz monofosfat yolu aktive olur. Bunların yanında NADP⁺'nin diğer bir kaynağı ise glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile glutatyon redüktaz sistemi oluşturmaktadır (Şekil 2.10).



Güçlü oksidan kaynaklarından birisi olan nötrofilik miyeloperoksidaz, hipoklorik asit (HOCl) üretimini katalizler. Bu reaksiyonun toksisitesi savunma amaçlı olarak bakterilerle mücadelede ve onların yok edilmesinde önemli katkıları olur. Ancak buna karşı, oluşan hipoklorik asit sağlıklı insan için dahi zararlıdır. Nitekim HOCl sağlıklı insan dokusunu zarara uğratarak iltihaplanmalara neden olmaktadır (61). Ayrıca bu

bileşikler girdikleri reaksiyonlarla mikroorganizmaya zarar veren toksik ajanları oluştururlar.

Zihinsel veya bedensel yorgunluk ile oluşan stres, serbest radikallerin üremesine neden olabilir. Ayrıca toksik maddelerin de serbest radikallerin üremesinde etkili oldukları bildirilmiştir. Toksik maddelerin doğrudan doğruya serbest radikal üretebilmelerinin yanında, bunlara karşı savunma görevi yapacak antioksidanların aktivitesini de düşürebilirler. Toksinin metabolizması sonucu ROS oluşur. Bazı antikanserojen maddeler DNA replikasyonunu baskılayarak O_2^- ve hidroksil radikallerinin (OH^\bullet) üretimine sebep olur.

Serbest radikal oluşumuna; kirlenmiş ve canlılar için riskli içme suyunda yeralan flor, klor, brom, iyot ve astatin gibi 7A grubunda bulunan elementlerle halojenen hidrokarbonlar, ayrıca toz ve duman hâlindeki kirleticiler de sebebiyet vermektedir. Hidrokarbonlar oksidatif stresin tetiklemekte çok önemli etkendirler.

Geçiş elementleri özellikleri nedeniyle serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör görevi üstlenirler (42). Metal iyonlarının; katarakt, ateroskleroz, diyabet gibi patolojik koşullarda serbest ve zararlı şekillerde bulunabilmektedir (61).

Bazı hormonlar vücutta stres reaksiyonlarına yol açıp bizzat kendileri de serbest radikallere dönüşebilir. İmmun/bağışıklık sisteminin hücreleri de hastalığa neden olan patojenlere karşı cevap olarak serbest radikal üretebilir.

2.7.1.2-Eksojen kaynaklar

Ultraviyole/morötesi ışınları, X-rays/röntgen ışınları, gamma ve mikrodalga ışınları, hava kirletici maddelerle su kirletici maddeler, sigara dumanı, egzoz dumanı, orman yangınları, volkanik faaliyetler, temizlik ürünleri, parfüm ve tarım ilaçları gibi kimyasallar serbest radikal üretimine katkıda bulunabilir.

2.7.2- Serbest Radikal Türleri

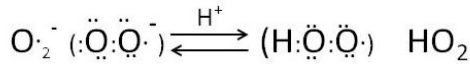
Serbest radikallerin en önemli kaynağı oksijen kaynaklı olan ROT'dir. Bunların çeşitli serbest radikallere kaynak oluşturacak serbest radikal zincir mekanizmasının ve zincir reaksiyonlarının başlatılmasında önemli etkileri vardır. Ömürlerinin çok kısa oluşları hızla tepkimeye girmelerinin önde gelen nedenlerindedir (Tablo 2.1). Süperoksit, hidroksil, peroksil, alkoksil, azot oksit, azot trioksit en çok rastlanan serbest radikallerdendir.

Tablo 2.1 Serbest radikal türleri

Reaktif Oksijen Türleri		Reaktif Nitrojen Türleri	
Radikal Olanlar	Radikal Olmayanlar	Radikal Olanlar	Radikal olmayanlar
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit H_2O_2	Nitrik oksit, NO^{\cdot}	Nitrosil, NO^+
Hidroksil, HO^{\cdot}	Hipoklorik asit, $HOCl$	Nitrogen dioksit, NO_2	Nitrikoksit, NO^-
Peroksil, RO_2^{\cdot}	Ozon, O_3		Dinitrojen trioksit, N_2O_3
Alkoksil, RO^{\cdot}	Singlet oksijen, 1O_2		Dinitrojen tetraoksit, N_2O_4
Hidroperoksil, HOO^{\cdot}	Peroksinitrit, $ONOO^-$		Nitronyum iyonu, NO_2^+
			Peroksinitrit, $ONOO^-$
			Alkil peroksinitrit, $ROONO$

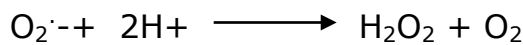
Aerobik hücrelerde moleküler O_2 'nin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda $O_2^{\cdot-}$ oluşur. Yüksek derecede reaktif olmayıp çoğunlukla hücrenin mitokondrisinde oluşur (13).

Doğrudan zarar verici olmayan $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 kaynağı ve geçiş elementleri indirgeyicisi olması nedeniyle önemlidir. $O_2^{\cdot-}$, düşük pH değerlerinde daha reaktiftir.



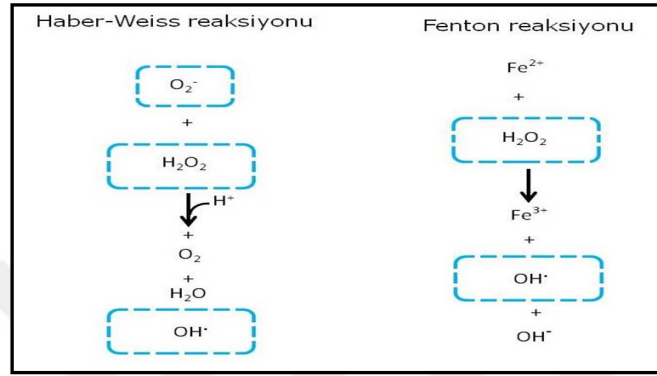
$O_2^{\cdot-}$, elektron transport sisteminde hem kompleks I hem de kompleks III'te üretilir ve anyonik forma dönüştüğünde mitokondrinin endomembranından kolaylıkla geçer. Kompleks I'e bağlı $O_2^{\cdot-}$ özellikle matriks içine bırakılır ve sağlam mitokondride herhangi bir kaçak ortaya çıkamaz (77).

Serbest radikal olmadığı halde serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar. Biyolojik membranlara nüfuz edebilir. Hidrojen peroksit, miyeloperoksidaz tarafından $HOCl$ 'e dönüştürülür. Bu sırada geçiş elementlerinin oksidasyonu yoluyla da OH^{\cdot} oluşmasına neden olarak serbest oksijen türlerinin üretimine aracı olurlar. Önemli fonksiyonlarından biri de hücre içi sinyal molekülü olmasıdır (30). Biyolojik sistemlerde H_2O_2 üretimi, $O_2^{\cdot-}$ dismutasyonu ile olur.



Buradaki reaksiyonda oluşan ürünler radikal olmayan ürünlerdir. Bu nedenden ötürü dismutasyon reaksiyonu olarak da bilinir. Bu kapsamdaki

serbest radikaller ya kendiliğinden yahut süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla katalizlenir. H_2O_2 yağda çözünür ve bulunduğu yerden uzakta Fe^{2+} içeren hücrel membranlarda da hasar oluşturabilir. H_2O_2 ; Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin bulunduğu ortamda $OH\cdot$ 'e dönüşür ve buna 'Fenton reaksiyonu' denir. H_2O_2 ; O_2^- bulunduğu ortamda ise en güçlü reaktif ve zarar verici olan $OH\cdot$ oluşturur ve buna da 'Haber-Weiss reaksiyonu' denir (Şekil 2.11) (10,42,64). Yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalan su, yarılanma ömrü kısa olan $OH\cdot$ oluşturur (7).



Şekil 2.11 Haber-weiss Reaksiyonu

2.7.3- Serbest Radikallerin Yararları

Serbest radikallerin etkileri yoğunluklarına göre değişmektedir. Sadece zararlı etkilerinden değil, düşük yoğunlukta olduklarında yararlı etkilerin de söz edilebilir. Serbest radikallerin artmadığı ve düşük yoğunlukta kaldıkları zaman: Enfeksiyon savunmasında, kanser hücrelerinin yok edilmedinde, detoksifikasyonlarda önemli rol oynar. Ayrıca intrasellüler depolardan Ca salınımında, tirozin amino asidini fosfatlama aktivasyonunda ve büyüme faktörü sinyallerinin aktivasyonu gibi hücrel sinyallerin aktivasyonunda rol oynamaktadırlar.

ROT hücrede gen transkripsiyonu gibi yaşamsal faaliyetlerde görev alır. Sinyal molekülü olan NO damarsal gevşemede, bağışıklıkta, iltihaplanmada, anti-pıhtılaşma aktivitede ve hafıza oluşumunda önemli rol oynar. Eşleşmemiş bulundurduğunda serbest radikallerden sayılır. Yoğunluğu az olduğunda önemli nitelikte yararlı işlevleri vardır. Hatta ideal bir fizyolojik haberci molekülü olduğu bildirilmiştir (112). Ancak aşırı yoğunluklu ve denetimsiz NO'ler hücreler için zararlı olmaktadır. Aynı zamanda önemli bir transmitter maddesi olan NO nöral plastisite için kilit role sahiptir. Süperoksit ve H_2O_2 ikinci haberciler gibi hareket edebilir (20,22,28,106).

Serbest radikaller; fagositoz aracılığıyla enfeksiyonlara karşı savunmada, sitotoksik lenfositler ve makrofajlar tarafından kanser hücrelerinin yok edilmesinde savunma fonksiyonlarına sahiptir. Serbest oksijen radikalleri bazı moleküllerin biyosentezi ile hücrel sinyallerin aktivasyonunda da rol oynar.

2.7.4- Serbest Radikallerin Zararları

Serbest radikallerin arttığı durumlarda hücre ve dokulara zarar vereceği konusunda tartışma yer yoktur. Ancak verilen zararların neler olduğu, türleri ve etkileri konusu henüz kesinlik kazanmamıştır. Bu yönde yapılan bilimsel çalışmalar hızla sürmekte ve ortaya konulan bilimsel veriler konunun çok daha fazla derinleştirilmesini ve üzerinde özenle durulmasını gerektirmektedir.

Serbest radikaller, insan hücresinde sağa sola bıkmaksızın saldırırlar. Bir insan hücresinin bir günde yaklaşık olarak 1.5×10^5 kez serbest radikallerin saldırısına uğradığı gerçeği dikkat çekicidir (51).

Cerebrum'da O_2 tüketiminin fazla olması, peroksitelebilen fosfolipidlerin oranının yüksek olması ve nöronların yenilenememesi gibi nedenlerden dolayı serbest radikal hasarına karşı hassastır. Cerebral iskemide geri dönüşümü olmayan ve ölümlle sonuçlanan nöron zararlanmaları da izlenmektedir. Cerebrum'da oluşan iske mi esnasında serbest radikallerin artmasıyla antioksidan mekanizmalar iyice zayıflar ve nöron hasarları da meydana gelir (46). Serbest radikallerin cerebrum'da belirlenen nörodejeneratif rahatsızlıklara neden olduğu belirtilmektedir (103). Oksidatif strese neden olan serbest radikaller, aynı şekilde nöron kaybıyla ortaya çıkan Alzheimer gibi rahatsızlıklara da neden olmaktadır.

Serbest radikaller öncelikle lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli yapılara hasar vererek, hücre fonksiyonlarını bozar ve hücre ölümüne (nekroz/apoptoz) neden olur.

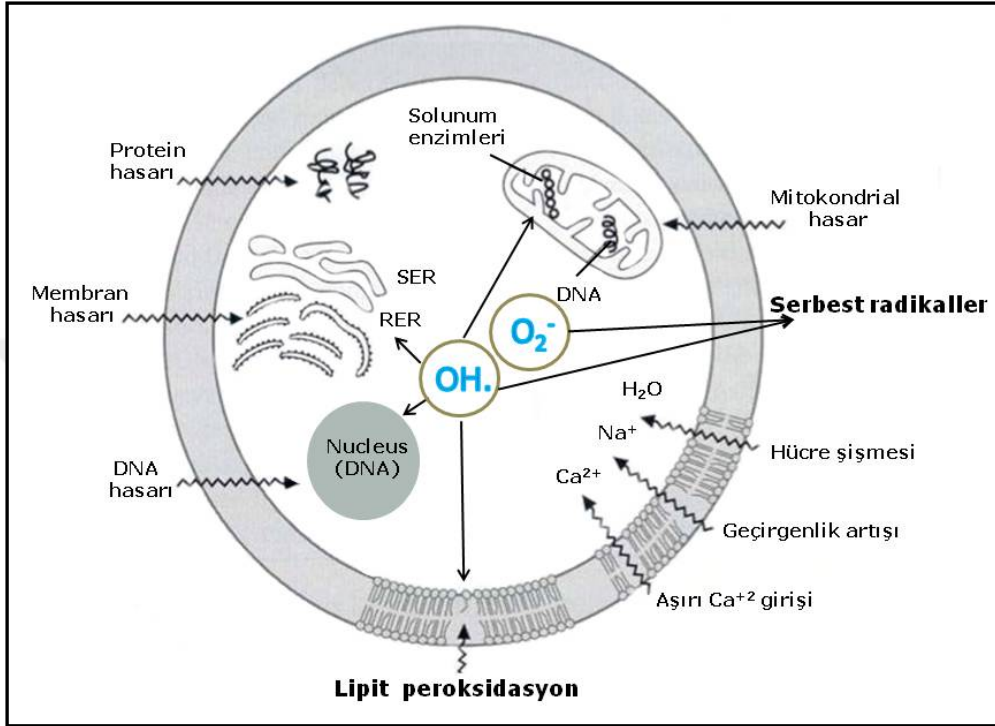
DNA yapısını bozarak çeşitli fonksiyon bozukluğuna, mutasyon ve kansere sebep olur. DNA hasarı hücre ölümüne yol açar. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'lar her gün çok sayıda ve birbiri ardına oksidatif hasara maruz kalmaktadır. SOR'nin sayılarının durumu, DNA hasarıyla hücre yaşlanmasının şiddetini belirler.

Yapılan çalışmalar yaş ilerledikçe okside protein kaynaklı karbonil miktarının arttığını ortaya koymaktadır. Yaşlanmaya bağlı olarak okside protein degradasyonunun da yavaşladığı aktarılmaktadır. Bu yavaşlamanın etkenleri arasında azalan proteolitik aktivite, reaktif oksijen çeşitlerindeki artış yanında çevresel faktörler de antioksidan sisteminin etkinliğinin azalmasına ya da kaybedilmesine, bunun ardından da umulmayan hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (119).

Serbest oksijen radikallerin hücre ve dokulara vereceği hasarların en önemli sonuçlarından biri lipid peroksidasyonu olup son yıllarda üzerinde önemle durulan bir konudur. Yüksek derecede zararlı etkilere yol açabilir. Kendiliğinden zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen lipid peroksidasyonu

vereceği hasarlarla çok daha fazla zararlıdır.

Lipit peroksidasyonu hücre zarının akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak hasar verebilir. Hücre zarında lipit peroksidasyonuna maruz kalan yağ asitleri de bulunmaktadır. Poliansatüre yağ asitleri bunların başında gelmektedir (Şekil 2.12).

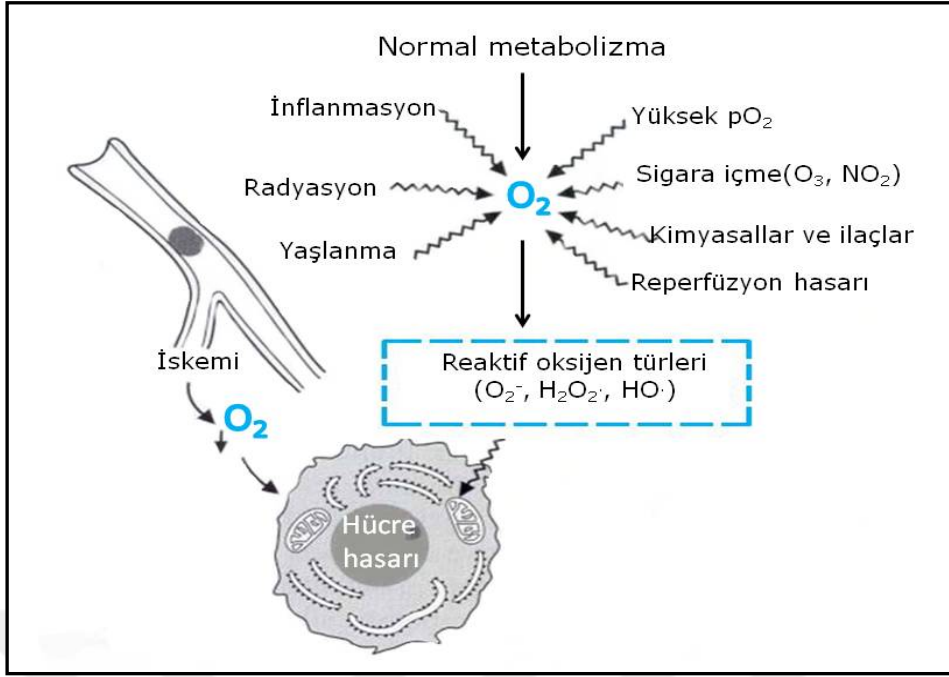


Şekil 2.12 Lipid peroksidasyon'un etkileri (84)

Proteinler ise serbest radikallere karşı duyarlılığı poliansatüre yağ asitlerine kıyasla daha fazladır. Proteinlerin etkilenmesinde ölçü, amino asitlerinin içeriklerine göre değişir. Sonuç olarak; serbest radikaller, proteinlerin fonksiyon ve enzim aktivitesine müdahale ederek hasarlarına neden olabilir. Hastalıkların yanı sıra yaşlılık sonucunu doğuran hasarlara da sebep olurlar (20,93).

Serbest radikaller karbohidratlara etki edip onlardan farklı ürünler oluşmasına ve bunların da patolojik süreçlerde önemli rol oynamasına sebep olur (20).

Özellikle atardamarların sertleşmesi, kalınlaşması ve kardiyovasküler hastalıklar ve serebrovasküler bozukluklar, ayrıca yaşlanma diabetes mellitus gibi hastalıklara yol açarlar (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Hücre hasarı (80)

Özellikle serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu toksinler, detoks organları tarafından vücuttan atılamazsa bağ dokuda depolanır ki bunlar da organ fonksiyonlarını bozarak birçok hastalığın temelini oluşturur (2,80).

2.7.5- Serbest Radikallerin Cerebrum Üzerine Etkileri

Cerebrum'u serbest radikal hasarına duyarlı yapan:

- Cerebrum'un düşük antioksidan savunmasına sahip olması,
- Ayrıca cerebral dokunun aynı zamanda oksidatif zararlara karşı dokuyu zayıflatan çoklu doymamış yağ asitler içermesidir. Bunların dışında sayılabilecek sebepler de vardır (83).

Cerebral iskeminin; hafıza bulanıklığı, Alzheimer, Parkinson gibi birçok sinirsel bozuklukta önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (73).

Serbest radikaller, merkezi sinir sisteminin patolojik durumlarının pek çoğunda, doğrudan doku hasarına neden olur. Serbest oksijen türleri, ekzitotoksisite, metabolik disfonksiyon ve Ca'un hücre içi hemostazisinde bozulma gibi çoğul mekanizmalarla doku hasarı meydana getirir (5,27,55,95).

2.8-Antioksidanlar

Genel anlamda serbest radikaller hücre, doku ve organlara zarar veren; antioksidanlar ise bunları ya da etkilerini yok etmeye çalışan maddelerdir. Antioksidanlarla serbest radikallerin sürekli bir savaş hâlinde

olduğu tıp dünyasınca belirlendikten sonra birçok tanımları yapılmış ve giderek çalışmaların odak noktası hâline gelmişlerdir (71).

Genel olarak serbest radikallerin sebebiyet verdiği oksidasyonları önleyen, aynı zamanda serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip olan maddelere antioksidan adı verilmektedir. Yapılan başka bir tanımda antioksidanların; organizmanın bütün gün boyunca ürettiği serbest oksijen radikallerini yakalayıp zararsız hâle getiren, verecekleri hasarı önleyen, hücre, doku ve organların istenen düzeyde faaliyet göstermesini sağlayan maddeler, olduğu belirtilmektedir. Bir başka tanımda antioksidanlar; gıdalarda oksidatif bozulmayı geciktiren veya önleyen bileşiklerdir, şeklinde tanımlanmıştır.

Uluslararası Gıda Kodeksi Komisyonu (CAC)'nun antioksidanlar için yaptığı tanım ise şöyledir:

Gıdalarda yağın acılaşma ve renk değişimi gibi oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatan maddelere antioksidan denir. Bu tanımda elbette gıda maddeleri ve onların sağlıklı tüketilme ömürleri esas alınmış olup renk yitimine uğrayıp antioksidatif etkileriyle ilişkilendirilmemiştir.

Organizma hücrelerinde olumsuz anlamda değişiklikler, geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz hasarlar oluşabilmektedir. Oluşan bu etkilerin yaşlanma ile birlikte arttığı genel kabul görmeye başlamıştır.

Antioksidanlar da serbest radikaller gibi çok yönlü sınıflandırmaya tabi tutulmuştur. Bu sınıflandırmalar arasında; etki mekanizmaları, enzim yapıda olup olmadıkları, kimyasal bileşimleri, doğal ve yapay yapıları, birincil ya da ikincil etkiye sahip olmaları gibi kıstaslar bulunmaktadır. Ayrıca endojen ve eksojen antioksidanlar, direkt ya da indirekt etkili olan antioksidanlar adıyla yapılan sınıflandırmalar ile bunların dışında yapılan sınıflandırmalar da bulunmaktadır (71,81).

Özellikle ROT'deki artışın antioksidan savunma sistemini etkisiz hâle getirerek oksidatif stresin oluşmasına sebebiyet vermesi hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Bilimsel araştırmalar, gıda ve vitaminlerin antioksidan savunma sistemini güçlendirdiğini göstermiştir.

2.8.1- Antioksidan etki mekanizmaları

Antioksidanların dört ayrı etki mekanizması bulunmaktadır. Etki mekanizmaları sınıflandırmalarda olduğu gibi birden çok ayırımı tabi tutulmuş olup bunlar arasında en çok bilineni:

- Bastırıcı etki
- Zincir kırıcı etki
- Toplayıcı etki
- Onarıcı etki şeklinde yapılan sınıflandırmadır.

Bu sınıflandırmaya göre: Antioksidanlar serbest radikalleri toplayıp bağlayarak kararlı hâle getirirler. Serbest radikallerin reaksiyonlarının hızını keserek onlara bir hidrojen verip aktivitelerini düşürmeleri yahut yok etmeleri bastırıcı etkileriyle gerçekleşmektedir. Onların kimyasal reaksiyonlarını durdurup zincirlerini kırarak etkisiz hâle getirmeleri zincir kırıcı etkiyle; DNA, protein ve lipitlerde oluşturulan hasarları onararak yeniden hayata döndürmeleri onarıcı etkiyle mümkün olabilmektedir (81).

Etki mekanizmaları bir başka sınıflandırmada:

- Süpürücü etki
- Dönüştürme etkisi
- Zincir kırıcı etki
- Onarıcı etki şeklinde ayırma tabi tutulmuştur.

Organizmada oluşan serbest radikaller, antioksidanlar tarafından etki mekanizmaları yoluyla benzer yöntemler kullanılarak etkisiz hâle getirilir. Bu etkilerin dışında bir de Enzimatik Etki yukarıda belirtilenler dışında en çok dile getirilen konulardan biridir. Enzimatik Etki, enzimatik olmayan antioksidanlarla organizmada bulunan SOD gibi antioksidan enzimlerin sentezini arttırarak etkilerini göstermeleri söz konusudur.

Antioksidanların sınıflandırılması konusunda en çok ilgi gören Endojen ve Eksojen sınıflandırmadır. Endojen Antioksidanlara örnekler Tablo 2.2'de sunulmuş, ayrıca bu tabloda geçen antioksidanların Enzim Yapıda Olanları ile Enzim Yapıda Olmayanları özellikle gösterilmiştir.

Tablo 2.2 Endojen Antioksidanlar

ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR	
Enzim Yapıda Olan Antioksidanlar	Enzim Yapıda Olmayan Antioksidanlar.
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)	Selenyum
Katalaz (CAT)	Ürik asit
Glutatyon redüktaz (GR)	α -lipoik asit
Süperoksit dismutaz (SOD)	Bilirubin
	Melatonin
	Glutatyon
	Albümin
	Seruloplazmin
	Transferrin
	Koenzim Q 10

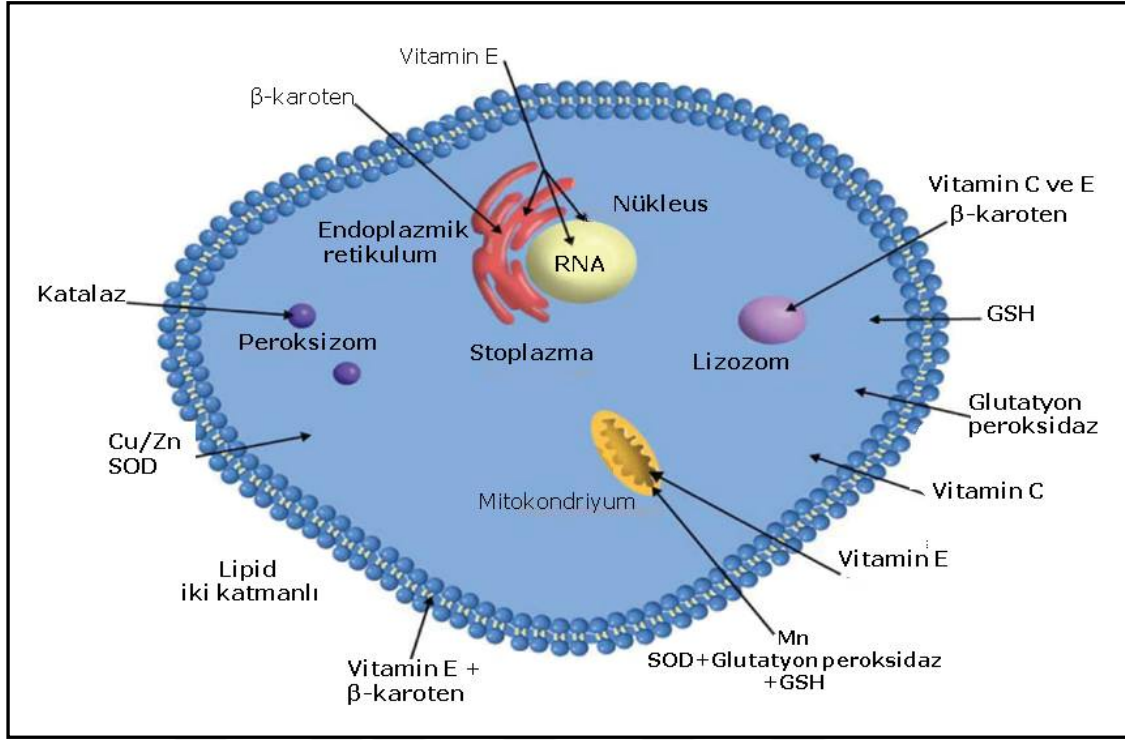
Eksojen Antioksidanlara örnekler Tablo 2.3'de sunulmuş, yine bu tabloda geçen antioksidanların Vitamin Olanları ile İlaç Olarak Kullanılanları özellikle gösterilmiştir.

Tablo 2.3 Eksojen Antioksidanlar

EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR	
Vitamin Olan Eksojen Antioksidanlar	İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar.
β -karoten (Vitamin A)	Rekombinant süperoksit dismutaz
Folik asit (Vitamin B9)	Endojen antioksidan aktiviteyi artırıcılar
Askorbik asit (Vitamin C)	Desferroksamin
α -Tokoferol (Vitamin E)	Nötrofil adezyon inhibitörleri
	Allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten
	Sitokinler
	Demir şelatörleri
	NADPH oksidaz inhibitörleri
	Barbitüratlar
	Mannitol, albümin
	Trolox-C

Perfüzyonun sağlanması sonucunda hücrelerdeki işlev bozukluğu kademeli olarak düzelirken, aynı zamanda hücre, doku ve organlarda ihtiyaç duyulan reaksiyonlar başlamaktadır. Ancak bu aşamada da hasarlar devam ettiğinden antioksidanlara duyulan ihtiyaç giderek artmaktadır (Şekil 2.14).

Antioksidanlar, son yörüngesinde eşlenmemiş elektron bulunduran serbest radikallerin bu elektronlarını tamamlayarak onları kararlı bir yapı hâline getirir, bunun sonucu olarak hücre, doku ve organlara zarar vermelerini önlemiş olurlar (50).



Şekil 2.14 Hücresel seviyede antioksidan etkinlik (50)

Hastalıkların nedenleri tek ve sınırlı olmayıp genelde multifaktöriyeldir. Organizmada oksidan ve antioksidan dengesinin sağlanması ve bunun devamlılığı öncelikle kronik hastalık patolojilerinde önem kazanmaktadır. Tedavide; hücre, doku ve organ arasında iletişim kurmak ve aralarındaki ilişkileri sağlıklı değerlendirmek önemlidir. Dokuların perfüzyon ve regülasyonun sonucundaki nöralterapi uygulamaları özellikle oksidatif stres açısından önemlidir (81,82).

2.8.2- Antioksidan savunma sistemleri

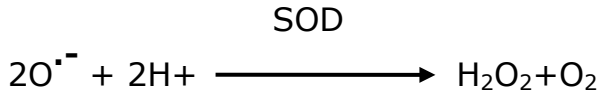
Başta reaktif oksijen radikalleri olmak üzere serbest radikallerin vereceği zararlara karşı mücadele eden ve onları durduran, engelleyen ve etkisiz kılan yapıya antioksidan savunma sistemi denir. Antioksidan savunma sistemi içinde yer aldığı söylenebilen enzimlerin bu savunmada önemli işlevleri bulunmaktadır. Önemli işlevleri olan enzimler aşağıda sunulmuştur (60).

2.8.2.1- Süperoksit dismutaz enzimi (SOD)

ROT ile antioksidanların karşılaşmasını bir savaşa benzetirsek SOD bu savaşta ilk savunma hattını oluşturmaktadır.

Enzimler arasında en güçlü antioksidan enzim olup serbest radikaller üzerinde sürüpürücü etkisi bulunmaktadır. SOD enzimi $\cdot O_2^-$ iyonunun H_2O_2 ve O_2 dönüşümünü hızlandırarak/katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltmakta önemli rol oynamaktadır. Bu olayda SOD enziminin aktif

bölgesini oluşturan çinko (Zn) da önemli bir mineral olarak görev yapmaktadır. SOD enzimi katıldığı kimyasal tepkimede hız artırıcı olarak yeterince güçlü bir katalist/hız artırıcıdır (60).



SOD; Cu, Zn ve Mn içeren süperoksit dismutaz (Cu/Zn/Mn SOD) olmak üzere hücrelerde üç kalıpta bulunur.

Cu ve Zn içerenler stizolde, Mn içeren mitokondride bulunur. Bunların dışında bir de ekstrasellüler dismutaz (EC SOD) adıyla hücre dışındaki sıvılarda bulunur. Hücre dışında bulunan EC SOD, oksidan hasarda ve çok sayıda akciğer rahatsızlıklarında önemli koruma görevi yapmaktadır.

2.8.2.2- Katalaz (CAT)

CAT, toksik H_2O_2 uzaklaşmasında kullanılır. Toksik H_2O_2 , CAT enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüştürülmektedir. Aynı zamanda redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalistlerindendir (60).

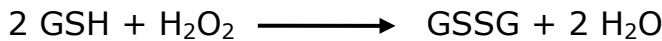


2.8.2.3- Glutasyon (GSH)

Çok güçlü antioksidan enzime sahip GSH ve GSH-Px, tiyol grupları ile enzimatik reaksiyonlar sonucu serbest radikalleri yakalarlar. GSH enzimi bütün hücrelerde bulunur ve zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rol oynar. GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiktir (90).

GSH serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar (76).

Aktivitesi için selenyum (Se) mineraline ihtiyaç duyan GSH-Px enzimi, glutasyon'un indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş hâle (GSSG) dönüştürmektedir.



2.8.2.4-Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px sitozolde bulunur, 4 Se atomu içerir, tetramerik yapıdadır. GSH-Px, peroksitlerin detoksifikasyonunda merkezi bir rol oynar. Lipid peroksidasyonun başlamasını ve gelişmesini engeller (32). Peroksit detoksifikasyonunda önemli etkinliğe sahip enzim; selenyum içeren tipidir.

Selenyumdan bağımsız olan tipinin ise antioksidan etkinliği düşüktür ve yalnızca lipid peroksitlerini metabolize eder (12).

GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelere düşük bulunmuştur. Lökosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur (70).

2.8.2.5- Ksantin oksidaz (KO)

KO, pürin katabolizmasında bir ara bileşik olan hipoksantini ksantine sonra da ürik aside dönüştürür. KO'ın reaksiyonu sonucunda süperoksit anyonu ve hidroperoksit radikalleri meydana gelmektedir.

2.9-Astaksantin

ASX karotenoidler arasında yer almaktadır. Bu nedenle önce karotenoidler, daha sonra ASX incelenecektir.

2.9.1-Karotenoidler

Karotenoidler; algler, bitkiler ile sınırlı sayıdaki mantar ve bakteriler tarafından üretilen, yediyüzün üstündeki sayıları ile yağda çözünebilir pigment grubudur (45). Karotenoidler sebze ve meyvelere kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renkleri veren maddelerdir (71). Karotenoidler ise lipofilik moleküllerdir. Genellikle organik çözücülerde ve lipidlerde çözünür, ancak suda çözünmezler. Bünyelerinde azot içermezler. Bunlar hidrokarbonlar, alkoller, aldehytlar, ketonlar ve hidrokarbonların asit türevleridir. Çoğu karotenoid, konjuge çift bağ içeren 40 C'lu yapıdadır. Karotenoidler konjuge çift bağların sayısına göre renk alırlar. Konjuge çift bağların sayısı arttıkça renkleri de gittikçe koyulaşır. Ancak konjuge çift bağlar dayanıklı olmayıp ısı (130°C), ultraviyole (UV) ışınları ve havanın oksijeniyle renksizleşir ve parçalanırlar (17).

Karotenoidler sahip oldukları özelliklere göre; karotenler, ksantofiller, karotenoid ketonlar ve karotenoid asitler şeklinde dört ana grupta toplanırlar. Karotenoidler doğada geniş olarak yer alan sarı, turuncu ve kırmızı renkli pigmentlerdir. Fotosentez yapan organizmaların hepsinde karotenoid yer almakta olup; alglerden bitkilere, mantarlardan bazı bakterilere kadar birçok canlı türünde rastlanmaktadır. Başlıca Karotenoidler arasında en çok birlenen ve inceleme konusu yapılan; β -karoten, likopen, ksantofil (lutein), violaksantin, zeaksantin ve ASX sayılabilir (17).

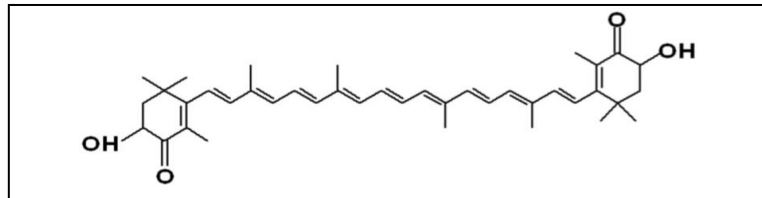
2.9.2-Astaksantinin bilim dünyasında bilinmesi

ASX ilk defa 1938 yılında istakoz ekstresinden elde edilmiş ve bu adla adlandırılmıştır. Tisher, 1944 yılında "Haematochrom" olarak bilinen pigmentin "astaksantin" olduğunu belirtmiştir. Droop 1954'te Haematococcus pluvialis'den ASX oluşumunu etkileyen parametreleri incelemiştir. 1963'te Sestak ve Baslerova, klorofil azalmasının ASX birikiminin işareti olduğunu bulmuştur. ASX'in proses analizi, 1968 yılında ilk kez ışık ve elektron mikroskopuyla Lang tarafından yapılmıştır. Santos ve Mesquita tarafından da 1984 yılında hareketsiz hücrelerde ASX sitoplazmada görülmüştür. Pigment granülleri herhangi bir organel içinde değildir. Olgun kistlerde çekirdek ve kloroplastta pigment yoktur, sitoplazma kırmızı renktedir (69) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Astaksantin

ASX'in kimyasal adı (3,3'-dihidroksi- β , β -karoten-4,4'-dion) şeklinde olup moleküler formülü ise $C_{40}H_{52}O_4$ şeklindedir (Şekil 2.16). Moleküler Ağırlığı 596.82'dir.



Şekil 2.16 Astaksantin'in kimyasal yapısı

Molekülü benzoid halkasının 3 ve 3'' pozisyonlarında yer alan iki asimetric C atomuna sahiptir. -OH düzlemin izdüşümüne yukardan bağlanırsa R konfigürasyonu, aşağıdan bağlanırsa S konfigürasyonu oluşur. ASX'in (3R,3'R), (3S,3'S) ve (3R,3'S) şeklinde esterleşmiş izomerleri vardır.

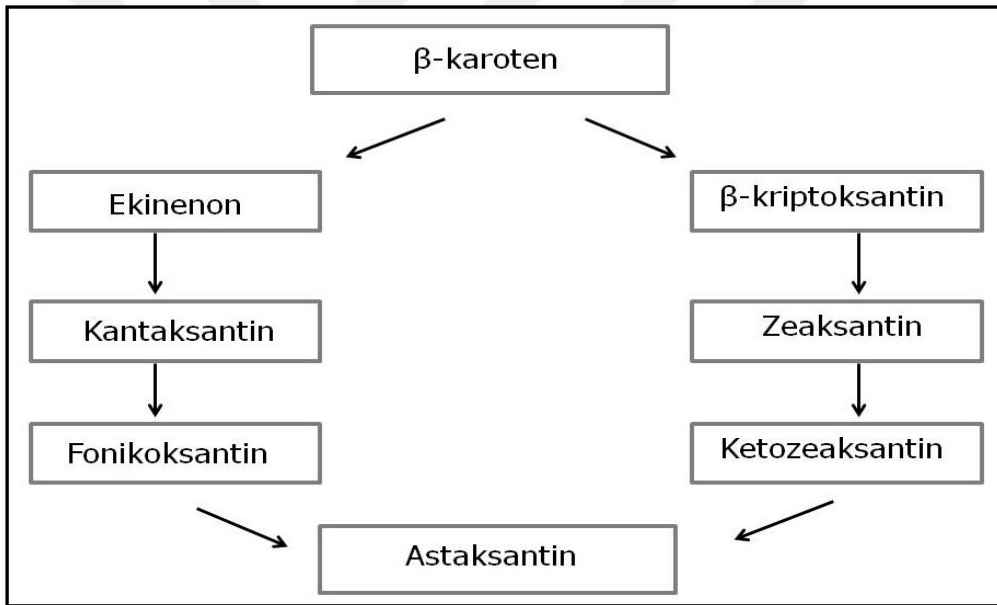
Haematococcus pluvialis flotow'da biriken ASX de esterleşmiş şekillerde olup, (3S,3'S) formu daha baskın durumdadır (97,116,118).

Dimetil sülfoksit (DMSO) (0.5 g/l), kloroform (10 g/l), diklorometan (30 g/l) ve aseton (0.2 g/l) gibi organik çözücülerde çözünür.

2.9.3- Astaksantin Kaynakları

ASX'in kimyasal sentetik formda ve doğal formda olmak üzere iki tipte bulunur. Sentetik formda olanlar, doğal olmayan konfigürasyonda astaksantin bileşikleri içerir. Mikroorganizma kullanılarak üretilen doğal kaynaklı ASX formu bu nedenle daha değerlidir (41,108).

ASX ilk defa bir istakoz ekstresinde 1938 yılında karakterize edilmiş ve adlandırılmıştır (75,95). Haematococcus'ta ASX birikim prosesinin analizi ilk defa ışık ve elektron mikroskobu ile 1968 yılında Lang tarafından yapılmıştır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 Haematococcus pluvialis'de astaksantin biyosentezi

1984 yılında Santos ve Mesquita, hareketsiz hücrelerde ASX'in ilk olarak küçük küresel biçimde sitoplazmada görüldüğü, pigment granüllerinin herhangi bir organel içinde olmadığı, olgun kistlerin çeşitli biçimlerdeki pigmentleri yüksek miktarda depoladıkları, ASX oluşum miktarındaki artış sonucu globüler granüllerin birleştiği, olgun kistlerde çekirdek ve kloroplastta pigment olmadığı ve sitoplazmanın kırmızı renkte olduğunu rapor etmişlerdir (69).

Haematococcus pluvialis'in kapalı sistemlerde (panel ya da tübüler fotobiyoreaktörler) yüksek ışık şiddetine (doğunluk noktasının üstünde) maruz bırakılarak ticari üretimi yapılmaktadır. Haematococcus pluvialis,

uygun olmayan ortam koşullarında biriktirdiği sekonder karotenoid olan ASX içermesi nedeniyle biyoteknolojik olarak önemlidir. ASX bazı eklem bacaklılar, balıklar ve alglerden elde edilen kırmızı-turuncu renkli, lipofilik bir karotenoid pigmentidir. Denizel ortamda ASX üretimi mikro algler ve fitoplankton tarafından sağlanır. Daha sonra sırasıyla zooplankton, böcekler, krustaseler ve diğer canlılar tarafından tüketilir (31).

Bakterilerden Micrococcaceae ve Mycobacteriaceae ailesinde ve mantarlardan Peniophora aurantica ve Peniophora quercina'de ASX vardır (19). ASX'in serbest formu kırmızı maya olan Phaffia rhodozyma'da, esterleşmiş formları ise Haematococcus pluvialis ve Chlorella zofingiensis (7)'de bulunur. Haematococcus pluvialis içeriğinde β -karoten, zeaksantin, kantaksantin, vitamin C ve vitamin E barındırır. Özellikle de 16:0, 18:1, ve 18:2 yağ asitlerine bağlı ASX mono esterlerini içermektedir. Serbest astaksantin tümü ve Haematococcus pluvialis'deki mono ve diesterleri görsel olarak saf izomer yapıya (3S, 3'S) sahiptir.

Bitkilerden en çok Brassicaceae üyelerinde, Arabidopsis thaliana'da ve kolza tohumunda rastlanmaktadır. Ayrıca metabolik mühendisliğinden yararlanılarak tütün çiçeğinde a ASX sentezi gerçekleştirilmiştir.

Kabuklu deniz hayvanlarından kuruma karidesi ve kaplan karidesinden izole edilen dominant pigment ASX olarak tespit edilmiştir. Bu pigment pişirme sırasında ortaya çıkan kırmızımsı pembe renkten sorumludur.

ASX sentezleyen diğer mikroorganizmalara göre en yüksek ASX içeriğine sahip olan yeşil alglerden Haematococcus pluvialis flotow olduğu rapor edilmiştir (48). Değerli bir pigment olan astaksantin ticari üretiminde, kullanılmaya en uygun adayın Haematococcus pluvialis flotow olması, bu algi özel ve önemli kılmalıdır.

2.9.4-Astaksantin Endikasyonları

ASX terpenler olarak bilinen geniş bir fitokimyasal grubuna dahildir. Fitokimyasallar, bitkilerde bulunan ve besleyici olmayan kimyasallardır. Bunlarda antioksidan etkisinin bulunması çalışmamız açısından önemlidir. ASX de çoğu karotenoidlerin gibi renkli, yağda çözünür bir pigmenttir. Ancak bazı karotenoidlerden farklı olarak insan vücudunda A vitaminine dönüşmez. A vitamini, insanda yüksek dozlarda olduğunda toksik etkisi göstermesine rağmen, ASX toksik etki göstermez. Diğer karotenoidlerden 10 kat daha güçlü antioksidan etki gösterir.

ASX, akuakültür ve gıda sanayiinde ve akuakültür alanlarda pigment kaynağı olarak kullanılır. Farmasötik ve kozmetik sanayilerinde de yüksek antioksidan aktivitesi nedeni ile kullanılır (16,27). Akuakültür sanayiinde pigment kaynağı olarak kullanılırken özellikle; karides, süs balığı, alabalık ve somon balığı yetiştiriciliğinde pigment kaynağı olarak kullanılması

dikkat çekicidir. Renk verici özelliğinin bulunması yanında, balıkların hızlı gelişimi ve yaşam oranlarının arttırılmasında da önemli bir yere sahiptir.

Kümes hayvanları üretiminde ise yumurta sarısının renklendirilmesi konusu en başta gelen kullanım alanıdır.

Artık ASX'nin gıda sanayiinde, besin takviyesi ve antioksidan olarak kullanımı iyice yaygınlaşmıştır (38). İnsanda esas olarak beslenme desteği olarak kullanılır. Doğal kaynaklardan veya sentetik olarak elde edilir. ASX'in hücre sağlığı üzerine etkisi, antikanser aktivitesi, antiinflamatuvar etkisi ve immun sistem üzerine etkileri, antidiyabetik etkisi ve göz sağlığı üzerine etkileri, iskelet kas sistemi ve cilt sağlığı üzerindeki etkileri, kardiyovasküler sistem üzerinde antihipertansif ve nöroprotektif etkileri, sempatik sinir sistemi ve mikrosirkülasyon üzerine etkileri ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir (12,24,46).

2.9.5-Astaksantin Antioksidan Etkisi

Karotenoidler bitkilere sarı, kırmızı ve turuncu rengi veren pigmentlerdir. Doğada yediyüzün üzerinde karotenoid olup güçlü antioksidan etkinliği olan karotenoidlerin en önemlileri; β -karoten, ASX, lutein, likopen, zeaksantin, kantaksantindir.

Karotenoidlerden olan ASX bilimsel çalışmalarda dikkat çekici bir önem kazanmıştır. ASX antioksidan etki mekanizmaları; Serbest radikalleri temizler, zincir reaksiyonlara karşı koruma görevi üstlenir ya da oluşan zincir reaksiyonları sonlandırır. Hücre zarı, hücre ve dokuları hasarlara karşı korur. Antioksidan aktivite; hidroksil, peroksil gibi serbest radikallere karşı hücreyi koruma görevidir. ASX antioksidan aktivitesi, Vitamin-E'den 500 kat, β -karoten'den 10 kat, lutein'den 4 kat daha etkilidir (41). Yapılan çalışmalarda ASX siçan karaciğer hücrelerinde gerçekleşen peroksidasyona karşı Vitamin E'den 100 kat daha iyi koruduğu bildirilmiştir (51,82).

ASX ısıya dayanıklı olup, renk değişikliği göstermemektedir. O₂ içermesi ve lipofilik olması nedeniyle kan beyin bariyerini kolaylıkla geçip merkezi sinir sistemi ile cerebrum'un hücrelerini koruyucu etki gösterir. Özellikle deniz canlılarının (karides, yengeç, istakoz ve balık yumurtaları) kabuklarında doğal olarak bulunan kırmızı-turuncu renkli bir pigment olup, hücre membran yapısının korunmasında etkili bir mekanizmaya sahiptir (66).

Yapılan çalışmalar ASX'in reaktif oksijen radikallerinin uyardığı Nükleer Faktör kappa B (NF-kB) aktivasyonunun inhibisyonuyla enflamasyonu azalttığını göstermiştir (62). NF-kB, son yıllarda bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır.

3- GEREÇ ve YÖNTEM

3.1-Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

Çalışmaya başlamadan önce Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun (HADYEK) 16.08.2016 tarih ve 544/2016 kayıt numaralı "etik açıdan uygundur" onayı alındı. Çalışma süresince uluslararası yönergelerde (15 Ekim 1978'de Paris UNESCO evinde Hayvan Hakları Evrensel Bildirisi ve Resmi Gazete 06.07.2006 tarihli 26220 numaralı Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik) belirtilen hayvan haklarına uyuldu. Çalışmamızda deney hayvanı olarak kullanılmak üzere enfeksiyonlara farelerden daha dirençli, karakteristik olarak saldırgan olmayan, meraklı ve rahatça eğitilen hayvanlar olmaları nedeniyle sıçanlar seçildi. Sıçan türünün belirlenmesinde ise günümüzde en yaygın kullanılan soy olan *rattus norvegicus* türüne ait albino sıçanlardan Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar seçildi. Bu sıçanlar geniş kafası, uzun kulakları ve vücuda göre kısa olan kuyrukları ile tanınırlar. Çalışmada kullanılacak olan erkek sıçanlar, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezinden (TICAM) temin edildi. Ağırlığı 180-200 gr arasında değişen toplam otuz iki adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik'in 4/u bendinde yer alan 3R İlkesi uygulanarak etik kurulumuzda 40 olan sıçan sayısı 32'ye indirildi. Sıçanların çalışma ortamına adapte olmaları deneyi olumlu yönde etkileyeceğinden çalışmaya başlamadan yaklaşık 2 hafta önce barınma ortamlarından alınıp deneyin yapılacağı yere getirilmeleri sağlandı. Sıçanlar, biyoretimlerine göre geceleri ve sabahın erken saatleri aktif olan canlılardır. Sıçanlar 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngü içerisinde, sıcaklığı $21^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de sabit, otomatik havalandırmalı odalarda tutuldu. Üstleri paslanmaz çelik tel örgülü 8 sıçan kapasiteli, polikarbon şeffaf kafeslerde kafes temizliğine özen gösterilerek barındırıldı. Barınmaları süresince serbest musluk suyu ve standart yem alımlarına izin verildi.

3.2- Deney Grupları

Deneyde kullanılan 32 adet erkek sıçan her grupta $n=8$ 'er adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

3.2.1- Kontrol grubu

Gruptaki sıçanlara cerrahi işleme başlamadan 30 dk. önce intraperitoneal (ip) yoldan 1 ml/kg DMSO [$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$] verildi. Sıçanlarda cerrahi müdahalenin etkisine bakmak ve diğer gruplar ile karşılaştırma yapmak için boyun diseke edilerek, a. carotis communis sinistra ortaya çıkarıldı ama klemp takılmadı. 15 dk. sonra boyundaki yapılar eski pozisyonuna getirilip deri kapatıldı.

3.2.2- Sham grubu

Gruptaki sıçanlara cerrahi işleme başlamadan 30 dk. önce ip yoldan 1ml/kg DMSO verildi. Sıçanların boynu diseke edilip, a. carotis communis sinistra ortaya çıkarıldı ve klemp takıldı. 15 dk. boyunca iskemi uygulandı. Sürenin sonunda klemp çıkarıldı ve boyundaki yapılar eski pozisyonuna getirilip deri kapatıldı.

3.2.3- Deney grubu 1 (ASX 25mg/kg)

Gruptaki sıçanlara cerrahi işleme başlamadan 30 dk. önce ASX [$\geq 97\%$ (HPLC), Haematococcus pluvialis, SML0982 SIGMA] 25 mg/kg olacak şekilde ayarlanarak 1 mg/ml DMSO içerisinde çözündürülerek İP yoldan verildi. Sıçanların boynu diseke edilip, a. carotis communis sinistra ortaya çıkarıldı ve klemp takıldı. 15 dk. boyunca iskemi uygulandı. Sürenin sonunda klemp çıkarıldı ve boyundaki yapılar eski pozisyonuna getirilip deri kapatıldı.

3.2.4- Deney grubu 2 (ASX 75mg/kg)

Bu gruptaki sıçanlara cerrahi işleme başlamadan 30 dk. önce ASX 75 mg/kg olacak şekilde ayarlanıp 1 mg/ml DMSO içerisinde çözündürülerek İP yoldan verildi. Sıçanların boynu diseke edildi, a. carotis communis sinistra ortaya çıkarıldı ve klemp takıldı. 15 dk. iskemi uygulandı. Sürenin sonunda klemp çıkarıldı ve boyundaki yapılar eski pozisyonuna getirilip deri kapatıldı.

3.3- Cerrahi İşlemler

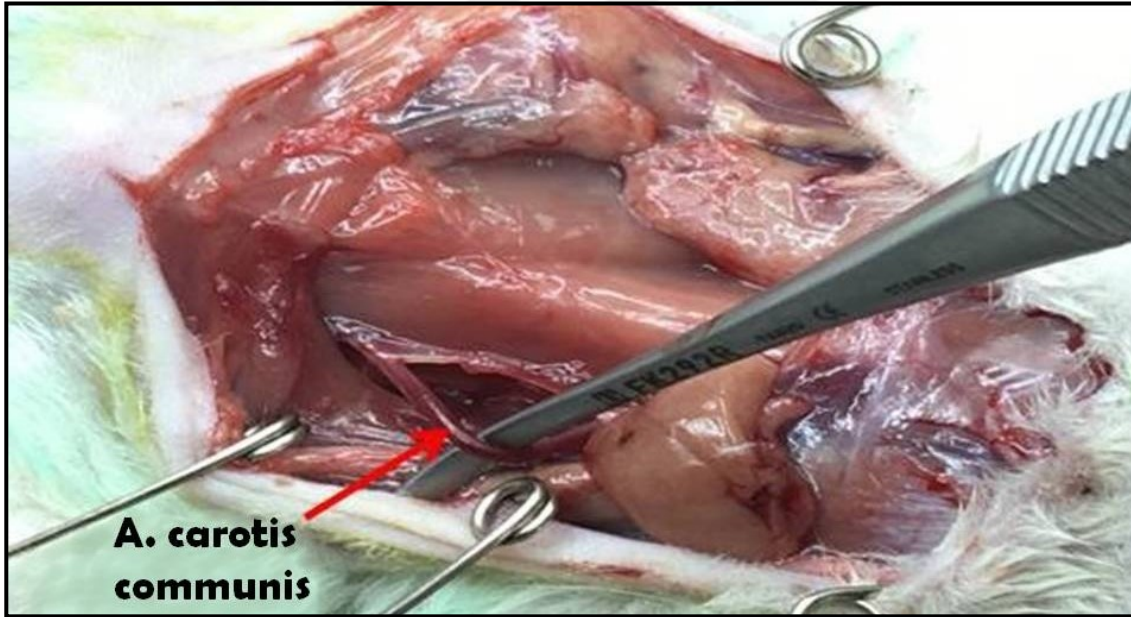
Madde (DMSO-Astaksantin) verilen sıçanlara, 30 dk. sonra intramusküler yolla 50 mg/kg ketamin (Alfamin, %10, Alfasan International B.V., 3440 AB, Woerden, Hollanda) ve 10 mg/kg ksilazin (Alfazin, %2, Alfasan International B.V., 3440 AB, Woerden, Hollanda) verilerek genel anestezi uygulandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Sıçana intramusküler anestezi yapılması

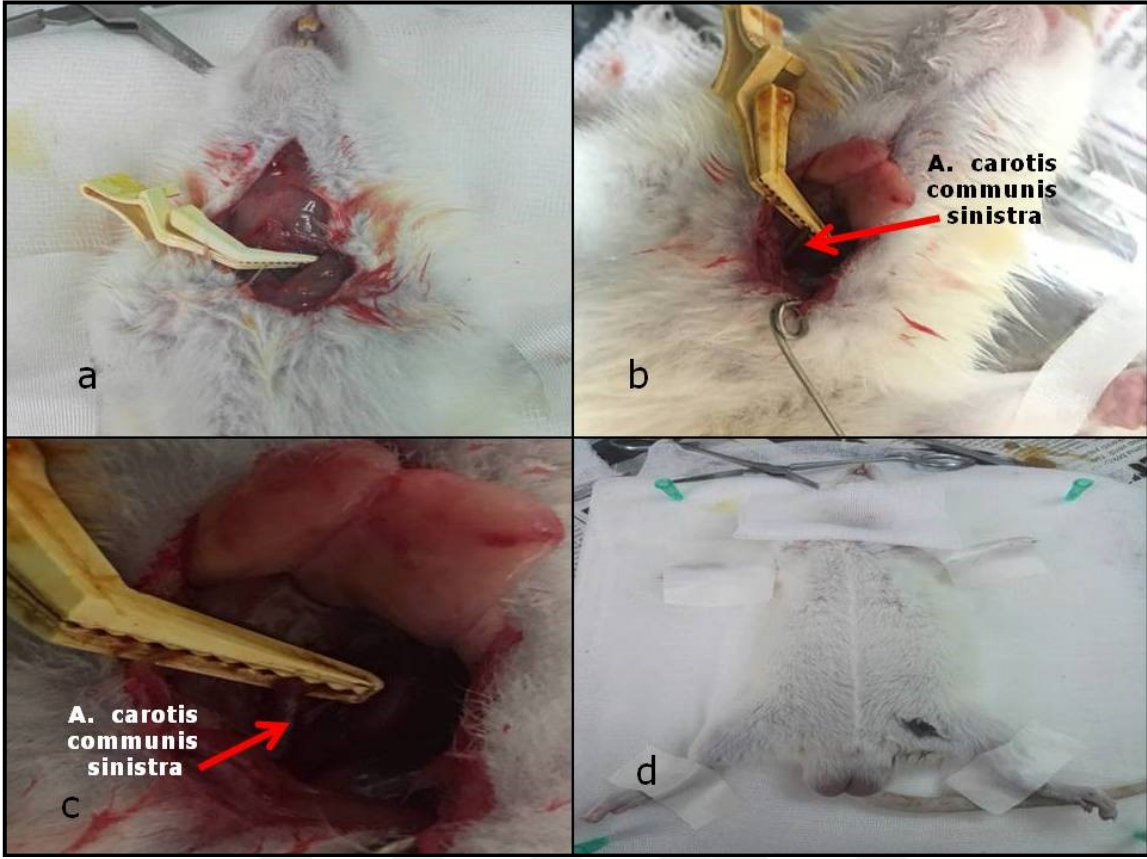
Cerrahi işlem sürecinde hareketsizliklerini sürdürmeleri amacıyla bazı sıçanlara anestezi ajanlarının aynı dozları tekrarlandı. Kuvvetli analjezik, hafif narkotik olan ve intramusküler yoldan uygulandığında hızlı absorbe edilebilen ketaminin biyoyararlanımı yaklaşık %93'tür. Ksilazin ise sedatif, hipnotik, analjezik ve kas gevşetici özelliklere sahiptir.

Genel anestezi uygulamasından sonra sıçanlar cerrahi masaya alınarak supin pozisyonunda ekstremitelerinden sabitlendi. Ardından geri çekme ve göz kırpmaya refleksi kontrol edildi. Sıçan boyun derisi %0,9 İzotonik Sodyum Klorür solüsyonu ile ıslatılıp jiletli ustura bıçağı ile tıraş edildi. Sonra boyun derisine orta hat üzerinde, 2 cm uzunluğunda vertikal cilt ve cilt altı insizyon uygulandı. Yüzeysel diseksiyon yapıldı. Fascia ve kaslar künt diseksiyonla ekarte edildi. Trachea ortaya çıkarılıp mm. paratracheales ve m. sternocleidomastoideus klemp yardımıyla kenara çekildi. Mm. infrahiyoidei serbestleştirildi. Yüzeysel mikrodiseksiyon yapıldıktan sonra derin mikrodiseksiyon ile a. carotis communis sinistra'ya doğru ilerlendi. Cerrahi işleme bir sonraki adımda mikroskop altında devam edildi. Arter, çevresindeki yapılardan ve vagina carotica içerisinde birlikte bulunup seyrettiği nervus vagus'tan dikkatlice ayrıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 A. carotis communis'in ortaya çıkarılması.

Düz uçlu Bulldog klemp damara yerleştirildi. Açık boyun bölgesinin üzerine serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bez yerleştirildi ve 15 dk boyunca iskemi uygulandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 a. carotis communis sinistra'nın ortaya çıkarılıp klemp takılması

Sürenin dolması ile klemp çıkarıldı. Reperfüzyonun gerçekleştiği nabızın tekrar hissedilmesi ile gözlemlendi. Kaslar ve boyundaki diğer yapılar tekrar eski haline getirildi. Deri altı doku ve deri 3-0 suture (3-0 DEXONTM II, 18"/45cm, CE-4, 19mm) ile her iki ucu birbirine yaklaştırılarak dikildi (Şekil 3.4). Sonra boyun derisine batikon (%10 Povidon İyodin poli iyot kompleksi içeren Batikon Antiseptik Çözelti) ile pansuman yapıldı. Sıçanlar tek olarak kafese yan yatırıldı, başının altı ve sırt bölgesi talaş ile desteklenerek ayılması beklendi. 24 saat boyunca sıçanlar canlı tutuldu.



Şekil 3.4 Derinin suture kullanılarak dikilmesi

3.4-Dokuların Diseksiyonu

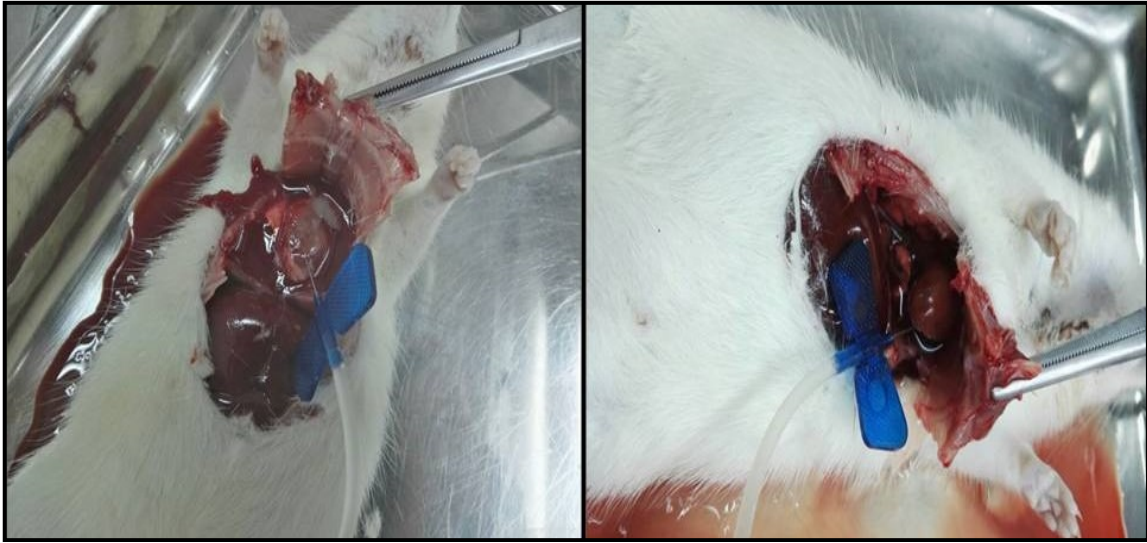
Deney hayvanlarının perfüzyonunda kullanılacak tampon solüsyonları diseksiyondan bir gün önce taze olarak hazırlandı. Bu amaçla önce pH 7,4 olan, 0.1M fosfat tampon solüsyonu [500 ml. distile suya 5 g monobazik (NaH_2PO_4) 10,875 g dibazik (Na_2HPO_4), Sigma] hazırlandı. Daha sonra bu karışıma %0,9'luk NaCl eklenerek fosfat tamponlu salin solüsyonu elde edildi. Fiksatif olarak %4'lük paraformaldehit solüsyonu kullanıldı. Solüsyon 40 g paraformaldehit (Sigma) tozunun 1lt. fosfat tampon içerisinde çözünmesiyle hazırlandı. Tüm kimyasal karışımlar manyetik karıştırıcıyla (MK 318) hazırlandı. Oda ısısında hazırlandıktan sonra soğumaya bırakılan karışımlar perfüzyon işleminde kullanılabilecek buzdolabında bekletildi. 24 saatin sonunda, sıçanlara IP yoluyla anestezi (ketamin 50 mg/kg ve ksilazin 5 mg/kg) uygulandı. Sıçanlar cerrahi masaya alınarak supin pozisyonda sabitlendi ve geri çekme ve göz kırpmaya refleksleri kontrol edildi. Sıçanlar sırayla anestezi uygulandıktan sonra intrakardiyak yolla perfüze edildi. Perfüzyon işlemlerinde peristaltik perfüzyon pompası (Vera Varistaltic Pump Plus) ve seti kullanıldı. Cerrahi makasla deri ve deri altı dokulara costa'ların alt seviyesinden horizontal istikamette kesi yapıldı. Processus xiphoideus seviyesinden diaphragma serbestleştirilerek thorax boşluğuna girildi. Costa'lar cerrahi makas yardımıyla, her iki tarafta mid-aksillar çizgi hizasından kesilerek, thorax'ın ön bölümü kaldırıldı. Kalp zedelenmeden çevresindeki destek yapılar dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Kalbin apeksinden K3E K3EDTA (VACUETTE® TUBE 2 ml 13x75) tüplere kan alındı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Sıçan thorax bölgesinin açılması ve kan alımı

Alınan kan +4°C'de 10 dk. süreyle 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant biyokimyasal ölçümler için ayrıldı ve ölçülene dek -85°C' de saklandı.

Daha sonra ventriculus sinister'den 3 mm girilen kelebek set ile dolaşıma önce fosfat tamponlu salin solüsyonu verildi. Kalbin atrium dextrum'una 1-2 mm'lik insizyon ile dolaşımdaki kanın drenajı sağlandı. Geri dönen kanın rengi berraklaşana kadar (8-10 dk. içerisinde) 20 ml/dk. hızında fosfat tamponlu salin verilmeye devam edildi. Kan saydamlaştıktan sonra paraformaldehit solüsyonu verilmeye başlandı (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Sıçanın perfüze edilmesi

Bu işleme perfüzyon hızı fiksasyon derecesine göre artırılarak, hayvanın vücudu katılaşıncaya kadar devam edildi. Perfüzyon işlemi sırasında fiksasyon sıvısı verilmeye başlandığında kas seğirmelerinin ortaya çıkışı ile fiksatifin dokulara ulaştığı anlaşıldı. İşlem tamamlandıktan sonra cerebrum diseksiyonuna başlandı. Sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi kullanılarak dekapite edildi. Cranium'ları midsagittal hat üzerinden deri insizyonu ile kemiğe ulaşıncaya kadar diseke edilip deri ve derialtı dokulardan serbestleştirildi. Cranium üzerindeki deri dikkatlice kesildikten sonra kasları olabildiğince kaldırıldı. Kaslar altındaki cranium kemikleri makas ve penset yardımıyla özenle kırılarak cerebrum görünür hâle getirildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Sığan cerebrum'unun dikkatlice çıkarılması

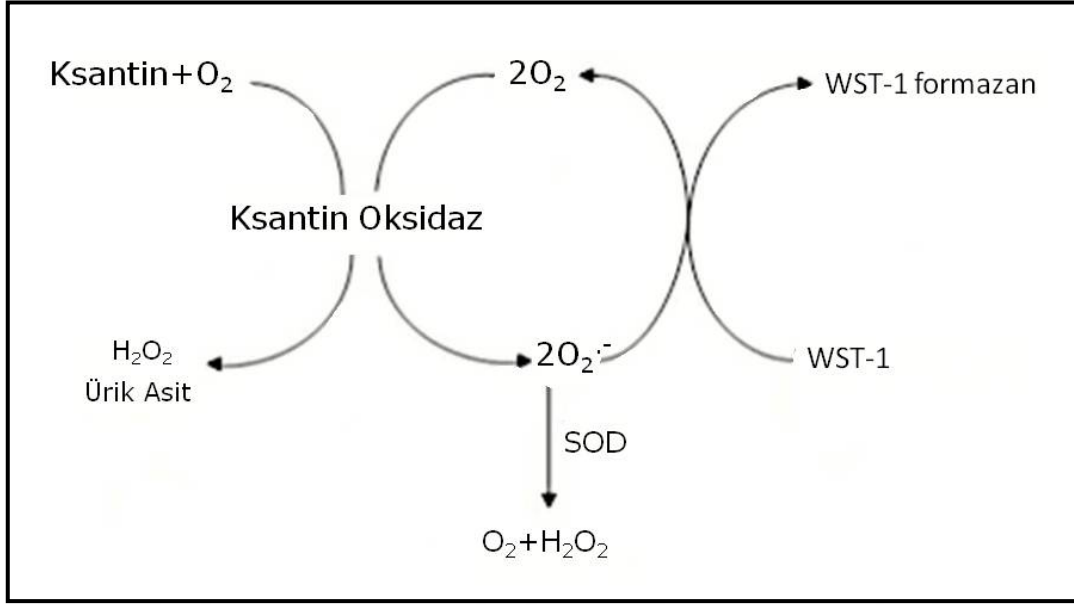
Cerebrum'a zarar vermemek için özen gösterildi ve taban kısmında bulunan sinirlerden dikkatlice serbestleştirildi. Arka tarafta cerebellum altından kesi yapıldı ve arkası serbest bırakıldı. Truncus encephali, medulla spinalis başlangıcından ayrıldı. Böylece cerebrum, cranium içinden dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

3.5- Kanların Biyokimyasal Analizleri

SOD enzimi Sun ve arkadaşlarının yöntemiyle Malondialdehit (MDA) tayini Esterbauer metoduyla (Lipid peroksidasyon ölçüm metodu), CAT tayini ise Aebi metoduyla çalışıldı. Dokular da histolojik incelemeye tabi tutuldu.

3.5.1- Superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü

$O_2^{\cdot-}$ 'nin, H_2O_2 ve O_2 dönüşmesini katalize eden SOD, en önemli antioksidatif enzimlerden biridir. SOD aktivitesini belirlemek için birkaç dolaysız ve dolaylı yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında kullanım kolaylığı nedeniyle nitroblue tetrazolium (NBT) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yüzden water-soluble tetrazolium salt (WST) reaksiyonuna dayanan SOD Determination Kit (Sigma Aldrich, Katalog No:19160) kullanılarak SOD aktivitesi belirlendi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Süperoksit Dismutaz ölçümünün şeması

3.5.1.1- Ölçüm yöntemi

Çalışma çözeltilerinin hazırlanması;

WST Çalışma Solüsyonu, 19 ml Tampon Solüsyonu ile 1 ml WST solüsyonu seyreltilerek hazırlandı.

Enzim Çalışma Solüsyonu, tüpün içindeki Enzim Solüsyonu 5 sn santrifüj edildi. Sonra 2.5 ml Seyreltme Tamponu ile 15 µl Enzim Çözeltisi sulandırılarak pipetle karıştırıldı.

SOD Solüsyonu: SOD Standart Solüsyonu hazırlamak için SOD, Seyreltme Tamponunda seyreltildi.

Yöntem;

1) Her numuneye ve blank 2 kuyucuğuna 20 µl örnek solüsyon eklendi. Blank 1 ve blank 3 kuyucuklarına 20 µl double-distilled su (ddH₂O) eklendi.

2) Tüm kuyucuklara 200 µl WST Çalışma Solüsyonu eklendi ve karıştırıldı.

3) Blank 2 ve blank 3 kuyucuklarına 20 µl Seyreltme Tamponu ilave edildi.

4) Tüm numunelere ve blank 1 kuyucuğuna 20 µl Enzim Çalışma Solüsyonu ilave edilerek iyice karıştırıldı.

5) Plaka'nın 20 dk boyunca 37°C'de inkübasyonu sağlandı.

6) Bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 450 nm'de absorban değerleri okundu.

7) SOD aktivitesi (%inhibisyon oranı)=[(Ablank1-Ablank3)-(Anumune-Ablank2)]/(Ablank1-Ablank3)X100 formülü kullanılarak hesaplandı.

3.5.2- Katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü

CAT neredeyse bütün canlı organizmalarda bulunan antioksidan enzimdir. H₂O₂'in su ve oksijene ayrışmasını katalize eder. İnsan katalazına yönelik optimum pH yaklaşık olarak pH 7'dir ve reaksiyon oranı pH = 6.8-7.5 arasında belirgin bir şekilde değişmediği için oldukça geniş bir maksimumdur.

CAT aktivitesi, amonyum molibdatla [(NH₄)₆Mo₇O₂₄4H₂O] stabil bir kompleks oluşturan H₂O₂'in spektrofotometrik olarak değerlendirilmesine dayanılarak ölçümler gerçekleştirildi (23).

3.5.2.1- Çözeltiler

1) Substrat solüsyonu pH 7.4; %30 H₂O₂'den 8,11 ml üzerine fosfat tamponu eklenip 1000 ml'ye tamamlandı.

2) 32.4 mmol/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄4H₂O çözeltisi; 8 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄4H₂O, 200 ml distile suda çözüldü. Her kullanımda taze olarak yapıldı ve kısa süreli beklemelemlerde vorteksten geçirilerek kullanıldı.

3) Tampon çözeltisi:

A) 4.08 g KH₂PO₄ alınarak 500 ml distile suda çözüldü.

B) 8.04 g Na₂HPO₄ alınarak 500 ml distile suda çözüldü.

3.3 ml A çözeltisi ile 100 ml B çözeltisi karıştırılarak ve pH=7.4'e ayarlandı.

3.5.3- Malondialdehit (MDA) düzeyi ölçümü

Lipit peroksidasyonu lipitlerin oksidatif bozulmasına karşılık gelir. Serbest radikaller, hücre zarında hasara yol açan lipitlerden (genellikle hücre zarlarında) elektron alırlar. Patofizyolojik süreçlerde oksidatif stresi değerlendirmek için lipit peroksidasyonunun niceliği şarttır. Lipit peroksidasyonu, son ürünlerinden biri olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği renk reaksiyonuna dayanılarak ölçülmüştür. Lipit

peroksidasyonunun son ürünlerinin ölçülmesi, oksidatif hasar için en yaygın kabul gören analizlerden biridir.

3.5.3.1- Çözelti hazırlama

1) 1 ml Fosforik asite, distile su ekleyerek 100 ml'lik %1 Fosforik asit çözeltisi yaptık.

2) 6 g TBA, 1000 ml suda çözündürerek %0.6 TBA çözeltisi yaptık.

3.5.3.2- Spektrofotometre ölçümü

1) Her ölçüm için kör ve örnek deney tüpleri hazırlandı.

2) Kör deney tüpüne; 0.5 ml distile su, 3 ml fosforik asit solüsyonu ve 1 ml TBA solüsyonu eklendi. Örnek deney tüpüne ise; 0.5 ml hemolizat, 3 ml fosforik asit çözeltisi ve 1 ml TBA çözeltisi eklendi.

3) İçerisinde su olan beherde kör ve örnek deney tüpleri 45 dk kaynatıldı.

4) Soğuyan deney tüplerine 4 ml butanol eklendi.

5) Kör ve örnek deney tüpleri sırasıyla 10 dk boyunca 3500 rpm'de santrifüj edildi. Ölçüm yapabilmek için süpernatant alındı.

6) 532 nm'de distile su ile sıfırlanarak Spektrofotometrede kör ve örnek deney tüplerinin absorbanları ölçüldü.

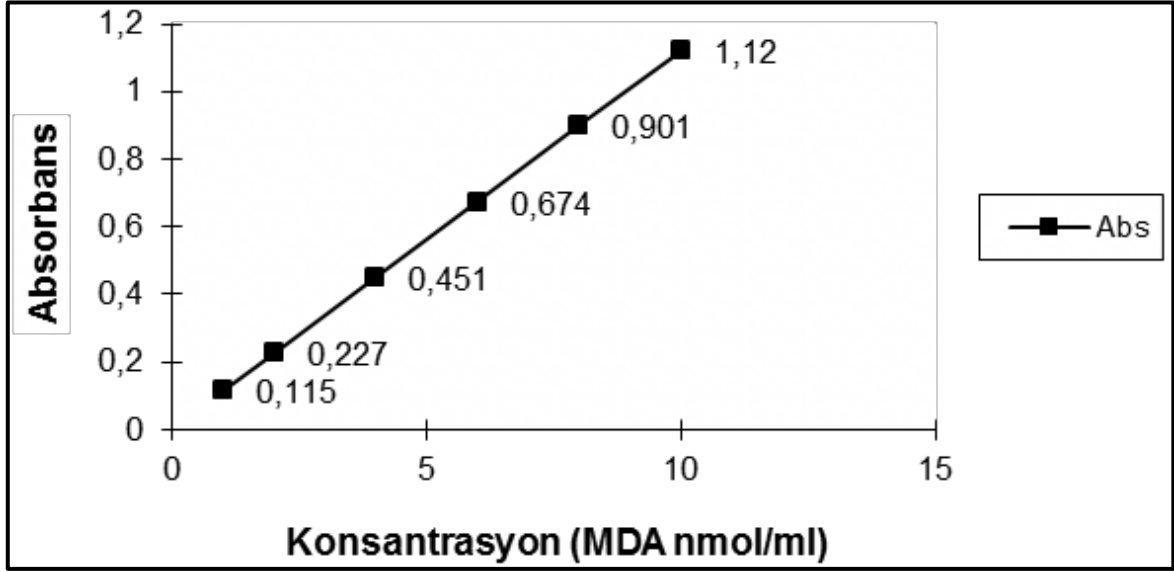
3.5.3.3- Hesaplama

1-Konsantrasyon ölçümü için; 1, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/ml'de standart lipit peroksit (1.1.3.3. tetraetoksipropan) hazırlandı.

2-Standart eğrisinin hazırlanması:

- Kör deney tüpüne; 0.5 ml distile su, 3 ml fosforik asit çözeltisi, 1 ml TBA çözeltisi konuldu.

-Standart deney tüplerine; 0.5 ml değişik konsantrasyonlarda standart, 3 ml fosforik asit solüsyonu ve 1 ml TBA solüsyonu eklenerek absorbanları okundu. Absorbanlar ile konsantrasyon değerleri milimetrik kâğıt üzerinde karşılaştırılarak standart eğrisi çizildi (Şekil 3.9). Standart eğri üzerinde spektrofotometreden okunan absorban değerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri okundu.



Şekil 3.9 MDA standart eğrisi

3.6- Dokuların Histolojik İşlemleri

Kontrol grubu, Sham grubu, Deney 1 (ASX25mg/kg) grubu ve Deney 2 (ASX75mg/kg) grubunu oluşturan tüm sıçanlardan histopatolojik değerlendirmeler için cerebral doku örnekleri alındı. Alınan cerebral doku örneklerinde mikroskopik düzeyde histolojik incelemeler yapılabilmesi için %10'luk formalin fiksasyonu için alınarak 1 hafta süreyle bekletilip fiksasyonları sağlandı. Daha sonra cerebral doku örnekleri, 3-4 saat boyunca çeşme suyunda fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla yıkandı. Yıkanan cerebral doku örnekleri 45'er dk. boyunca sırasıyla aşamalı olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol çözeltilerinde bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Şeffaflandırılmak üzere cerebral doku örnekleri 2 kez 20'er dk. ksilolde (Sigma, C₆H₄(CH₃)₂) bekletildi. Ardından cerebral doku örnekleri etüv içinde 65°C'de eritilmiş üç ayrı parafin için alınarak sırayla 60 dk. süreyle bekletildi. Parafinizasyon işleminden sonra cerebral doku örnekleri kesit alınmaya hazır duruma getirilmek için ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı. Kesit almak için kullanılacak mikrotom bıçağı (Leica) buzdolabında soğutuldu. Mikrotom aracılığı ile her bir cerebral doku örneklerinden 5'er µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlandı ve buzlu, tıraşlı, yaklaşık kalınlık 1.1 mm olan temiz mikroskop lamalarının (ISOTHERM) üzerine alınarak etüv içinde 1 saat süre ile bekletildi. Preparatlara deparafinizasyon sağlamak için 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde (C₈H₁₀) tutularak boyama aşamasına geçildi. Preparatların boyama işleminde HE ikili boyası kullanıldı. Preparatlar 5'er dk. süreyle sırayla %96, %90, %80, %70'lik alkol çözeltilerinde ve distile su içerisinde bekletildi. Preparatlar, Hematoksilen ile 2 dk. ve Eozin ile 10 dk. boyandı. Sonradan fazla boyayı almak için çeşme suyu ile hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular sırasıyla iki farklı ksilolde 30 dk boyunca tutularak şeffaflaştırıldı. Şeffaflaşan dokular daha sonra entellan ile kapatıldı.

Mikroskopik düzeyde inceleme için ışık mikroskobu (Olympus BH-2) ile değerlendirmeleri yapıldı ve cerebral doku içeren bütün preperatların dijital kamera (Olympus DP-70) yardımıyla fotoğrafları çekildi.

3.7- İstatistiksel Analizler

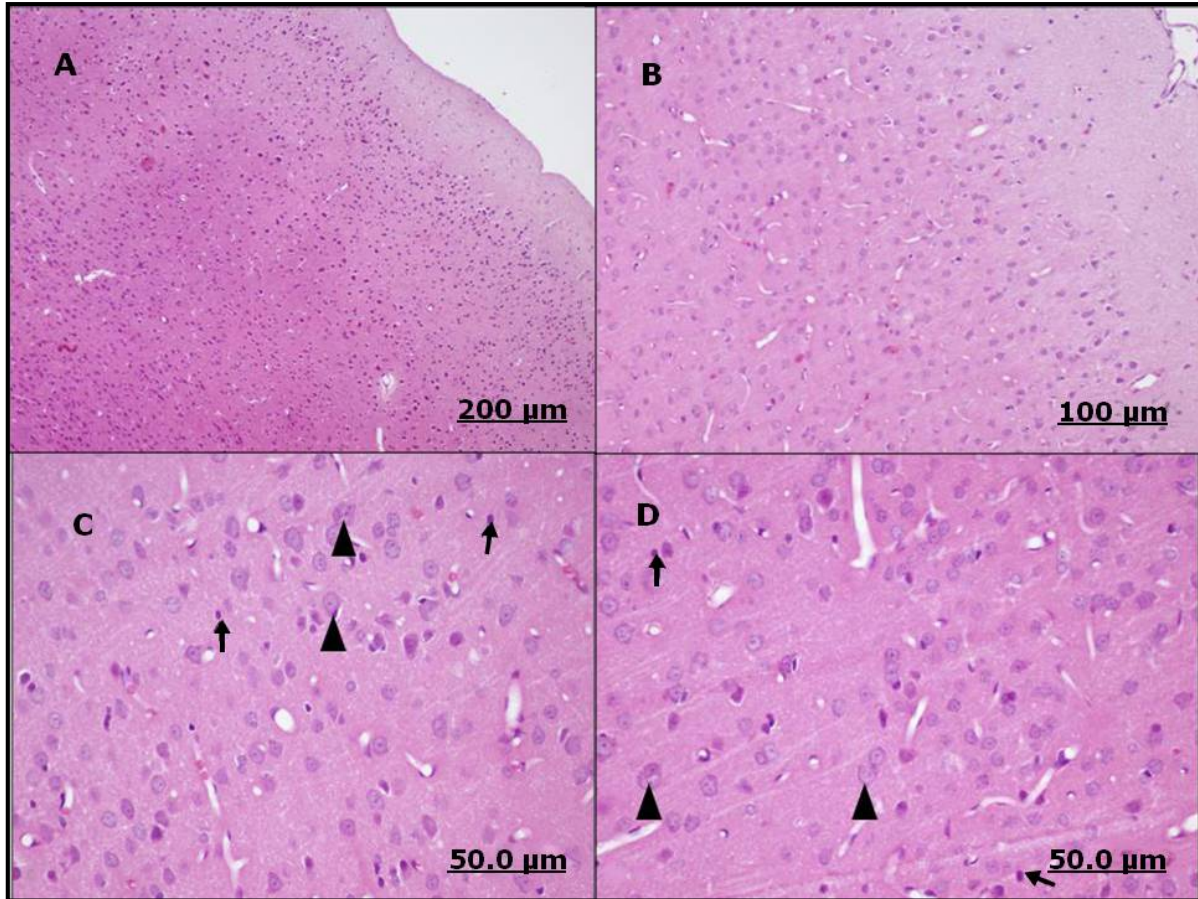
Elde edilen sonuçların istatistiksel analizlerinin yapılmasında, IBM SPSS Statistics 21 paket programından yararlanıldı. Tanımlayıcı datalar ortalama \pm standart sapma olarak verildi.

Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar sonucunda veriler normal dağılıyor ise Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA, Post hoc: Tukey) kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen çoklu grupların değerlendirilmesinde ise Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. Dataların normal dağılım varsayımına uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak anlamlılık için $p < 0.05$ değeri kriter kabul edildi.

4-BULGULAR

4.1-Histolojik Sonuçlar

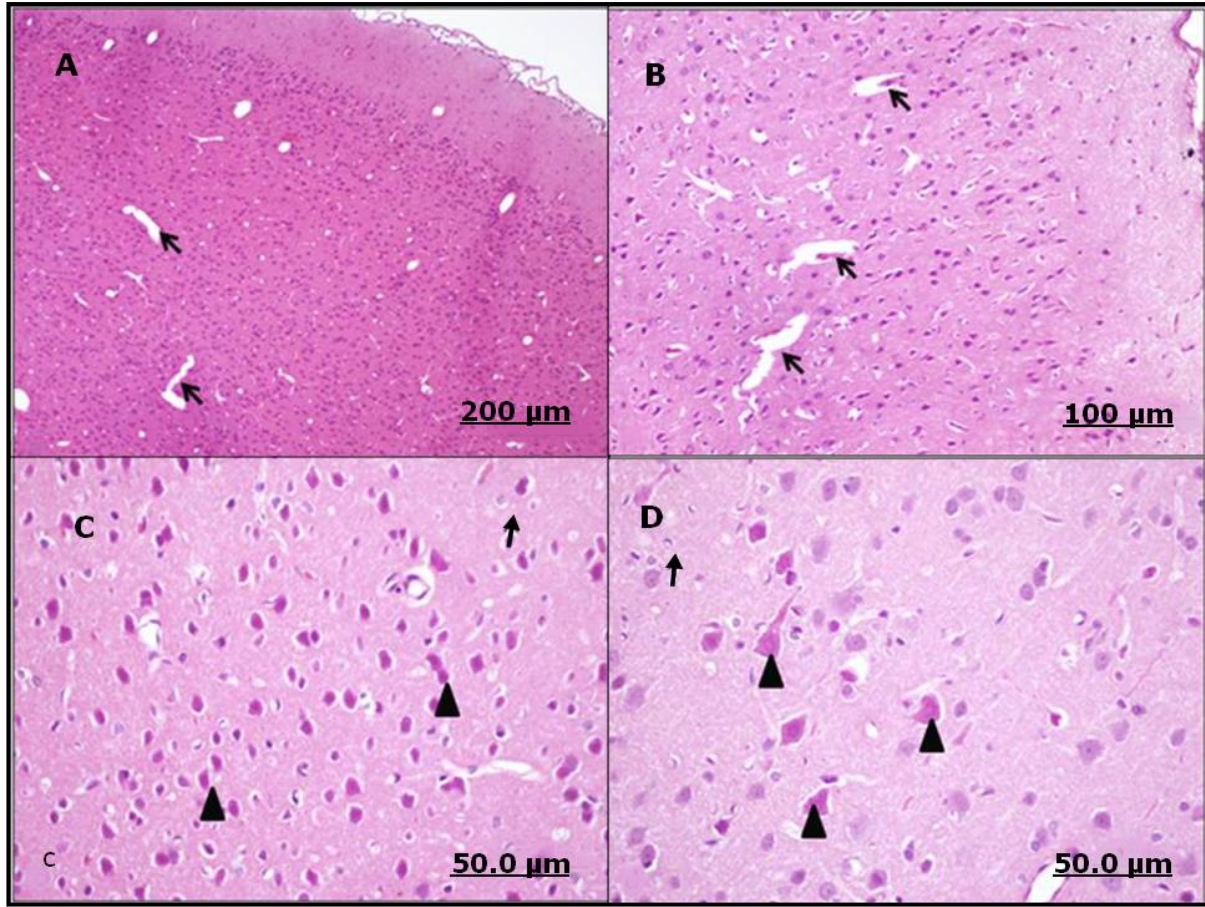
Kontrol grubuna ait deney hayvanlarından alınan cerebrum örneklerinin ışık mikroskobu altında değerlendirilmesi sonucu, cerebrum normal histolojik yapıda görüldü. Ayrıca kortikal alanda normal görünümlü nöronlar ve glial hücreler gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Kontrol grubu sonuçları

Kortikal alanda normal görünümlü nöronlar (▶) ve glial hücreler (→) izlenmekte (a-d) (scale bar: 200µm, scale bar: 100µm, scale bar: 50.0µm, HE).

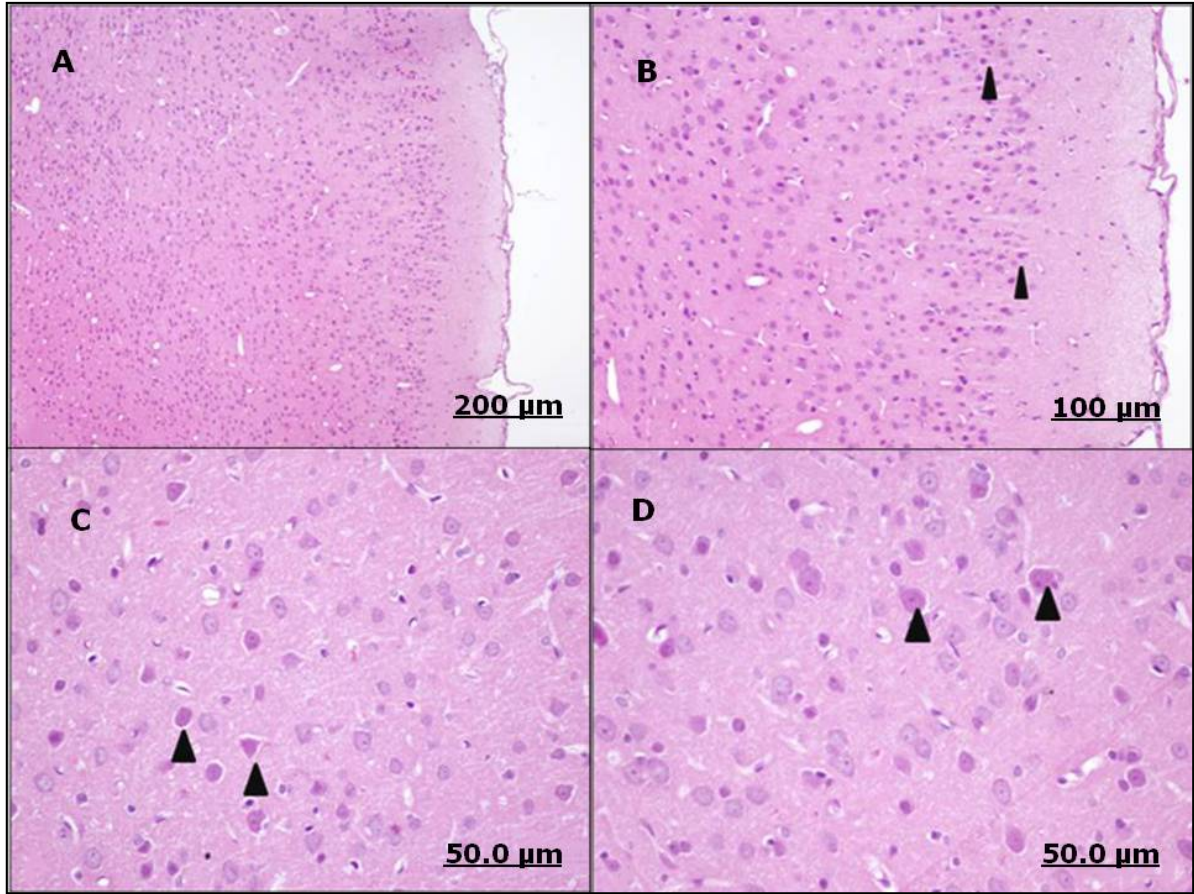
Sham grubuna ait deney hayvanlarından alınan cerebrum örneklerinin ışık mikroskobu altında değerlendirmesi sonucu, cerebral korteksinde yoğun hasar ve çok sayıda nekrotik nöron gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Sham grubu sonuçları

Kortikal alanda yoğun hasar (→) ve çok sayıda nekrotik nöron (▶) izlenmekte (a-d) (scale bar: 200µm, scale bar: 100µm, scale bar: 50.0µm, HE).

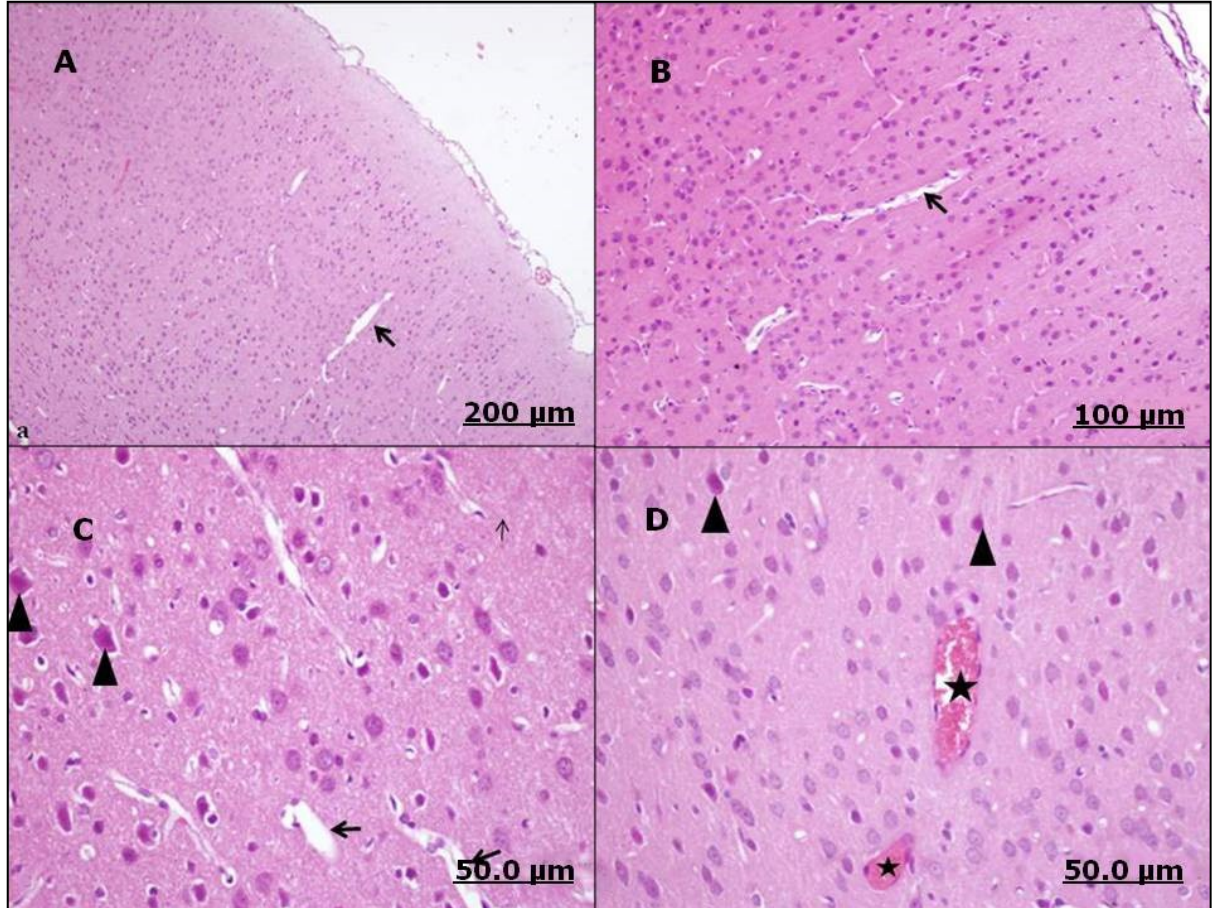
ASX25mg/kg grubuna ait deney hayvanlarından alınan cerebrum örneklerinin ışık mikroskobu altında değerlendirmesi sonucu cerebrum korteksinde, Sham grubuna göre azalmış hasar dikkat çekti. Nekrotik hücre sayısında azalma gözlemlendi. Normal görünümlü nöronlarla birlikte az sayıda nekrotik nöronlar gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 ASX25mg/kg grubu sonuçları

Kortikal alanda azalmış hasar dikkat çekmekte. Normal görünümlü nöronlarla birlikte az sayıda nekrotik nöronlar görülmekte (►) (a-d) (scale bar: 200µm, scale bar: 100µm, scale bar: 50.0µm, HE).

ASX75mg/kg grubuna ait deney hayvanlarından alınan cerebrum örneklerinin ışık mikroskobu altında değerlendirmesi sonucu, cerebrum korteksinde Sham grubuna göre azalmış hasarla birlikte kortikal alanda kısmi hasar gözlemlendi. Histolojik değerlendirmede, normal görünümlü nöron yapılarının dışında az sayıda nekrotik nöronlar da dikkat çekti. Ayrıca vasküler konjesyon gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. ASX75mg/kg grubu sonuçları

Kortikal alanda kısmi hasar (→) ile birlikte normal görünümlü nöron yapılarının dışında az sayıda nekrotik nöronlar da dikkat çekmekte (►). Ayrıca vasküler konjesyon gözlenmekte (*) (scale bar: 200µm, scale bar: 100µm, scale bar: 50.0µm, HE).

4.2-Biyokimyasal Sonuçlar

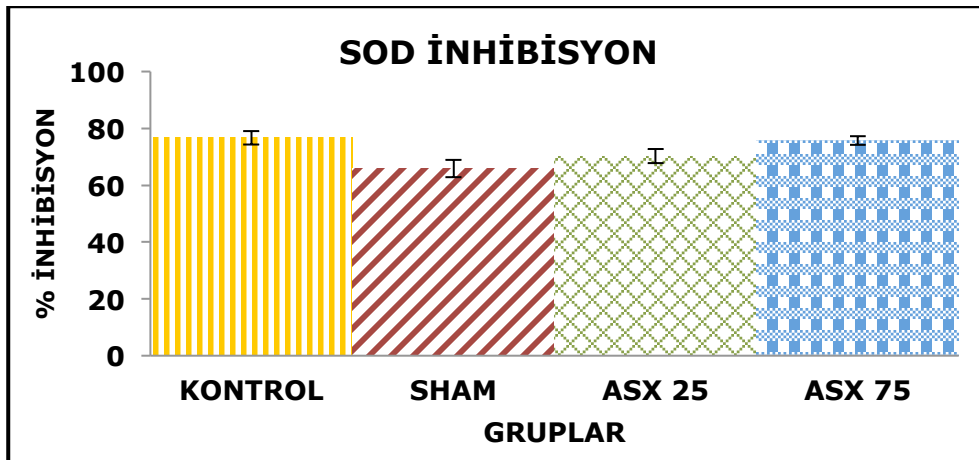
4.2.1-SOD değerleri

Kanda SOD değerlerinin (% inhibisyon)(ortalama±standart sapma) sayısal ayrıntıları Tablo 4.1’de, aynı değerlere ilişkin grafik ise Şekil 4.5’te verildi. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında iskemi uyguladığımız, ancak madde vermediğimiz Sham grubu değerinin en düşük düzeyde olduğu gözlenmektedir. Bu durum, iskemi ile birlikte artış gösteren serbest radikaller karşısında antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığını göstermektedir.

ASX25mg/kg grubu değerlerinin anlamlı bir şekilde artması verdiğimiz maddenin (ASX’in) anlamlı bir şekilde antioksidan sistem üzerinde koruyucu etki yaptığını göstermektedir. ASX75mg/kg grubunda da koruyucu etki artarak Kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır. Ancak verilen maddenin dozundaki artış, ASX25 mg/kg grubunun koruyucu etkisi oranında artış göstermemiştir. Bu durum ASX’in artan dozla birlikte koruyucu etkisinin de artmaya devam ettiğini, ancak hızının giderek azaldığını bildirmektedir.

Tabo 4.1 Gruplara ait SOD düzeylerinin dağılımı

Grup no	Gruplar	N	SOD (% inhibisyon) Ortalama ± Standart sapma	F	P	Çoklu Karşılaştırma			
						1	2	3	4
1	Kontrol	8	76,725±2,439	34,603	<0,001		***	***	ns
2	Sham	8	65,883±3,062			***		**	***
3	ASX25mg/kg	8	70,190±2,470			***	**		**
4	ASTX75mg/kg	8	75,735±1,506			ns	***	**	



Şekil 4.5 Gruplara ait SOD düzeylerinin dağılımı

4.2.2- CAT değerleri

Kanda CAT değerleri (mmoles/min/mg protein)(Ortalama \pm Standart sapma) Tablo 4.2'de, aynı değerlere ilişkin grafik ise Şekil 4.6'da verildi. Genel olarak SOD değerleriyle benzerlik gösterdiği izlendi.

Sham grubu değerinin en düşük düzeyde olması, iskemi ile birlikte artış gösteren serbest radikaller karşısında antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığını göstermektedir.

ASX25mg/kg grubu değerlerinin anlamlı bir şekilde artması verdiğimiz maddenin (ASX'in) anlamlı bir şekilde antioksidan sistem üzerinde koruyucu etki yaptığını, ASX75mg/kg grubunda ise koruyucu etkinin artarak devam ettiği ve Kontrol grubu değerlerine iyice yaklaştığı gözlenmiştir.

Tablo 4.2 Kanda CAT değerleri

Grup no	Gruplar	n	Katalaz (mmoles/min/mg protein) Ortalama \pm Standart sapma	F	P	Çoklu Karşılaştırma			
						1	2	3	4
1	Kontrol	8	18,3813 \pm 1,62	29,191	<0,001		***	**	ns
2	Sham	8	14,3263 \pm 0,497			***		***	***
3	ASX25kg/kg	8	16,6713 \pm 0,216			**	***		*
4	ASX75mg/kg	8	17,8163 \pm 0,535			ns	***	*	



Şekil 4.6. Gruplara ait CAT düzeylerinin dağılımı

4.2.3-MDA değerleri

Kanda MDA değerleri (nmol/ml)(ortalama±standart sapma) Tablo 4.3'te, aynı değerlere ilişkin grafik ise Şekil 4.7'de verildi.

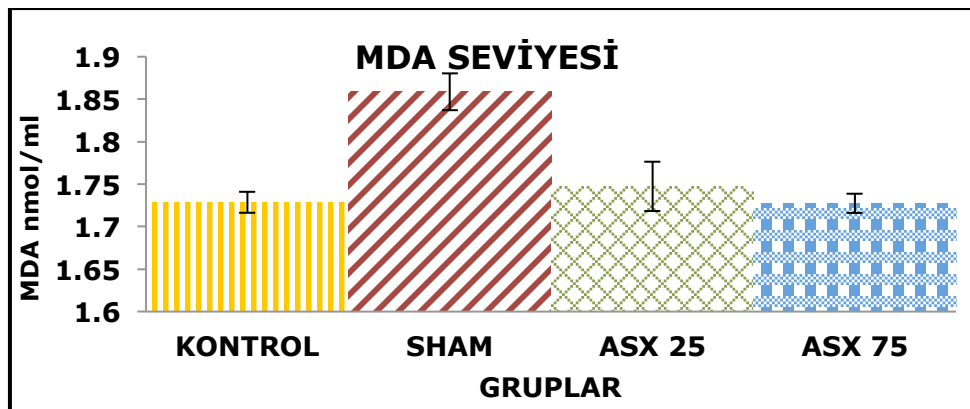
Sham grubu ile diğer gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Sham grubu MDA değerleri anlamlı bir Şekilde yksek gcrmlmüŐtür. Bu durum iskemi sonrası cerebrum'da hasarın oluştuğunu gstermektedir.

ASX25mg/kg grubu değerlerinin hızla düşmesi ve Kontrol grubu değerlerine yaklaşması verilen maddenin (ASX) beyin üzerinde anlamlı bir Şekilde koruyucu etki yaptığını gstermektedir.

ASX75mg/kg Grubu değerlerinin Kontrol grubu değerlerinin altına düşmesi ASX'in beyin üzerinde tam (%100) koruyucu etki yaptığını gstermektedir.

Tablo 4.3 Kanda MDA değerleri

Grup no	Gruplar	n	MDA (nmol/ml) Ortalama ± Standart sapma	F	P	Çoklu Karşılaştırma			
						1	2	3	4
1	Kontrol	8	1,7288±0,01246	78,237	<0,001		***	ns	ns
2	Sham	8	1,8588±0,02167			***		***	***
3	ASX25mg/kg	8	1,7475±0,02915			ns	***		ns
4	ASX75mg/kg	8	1,7275±0,01165			ns	***	ns	



Şekil 4.7 Kanda MDA değerleri

5- TARTIŞMA

İskemi sonrası oluşan hastalıklar günümüzde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Özellikle iskemiye bağlı serebrovasküler hastalıklar; ciddi mortalite ve morbiditeye yol açan hastalıkların başında yer almaktadır. Klinik gözlem ve modern görüntüleme yöntemleriyle gerçekleştirilen güncel araştırmalar, cerebral iskemide süreye bağlı olarak geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz hasarın değişken olduğunu göstermektedir.

Yapılan çalışmalarda iskemi oluşturmak için sıklıkla iki taraflı ACC ve a. cerebri media ligasyonu kullanılmaktadır. Çalışmamızda deneysel iskemi modellerinden biri olan a. carotis communis İ-R modelini uygulayıp ASX'in antioksidan sistem ve cerebrum üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırdık.

Bu modelin seçiminde; cerrahi işlemin dikkat ve özenle yapılmasına uygun olması, uzun süreli sağ kalımlara elverişli bulunması, düşük başarısızlık oranının görülmesi, istenilen hasarı verebilmesi ve erken ölümlere rastlanmaması gibi avantajlar tercih sebepleri olmuştur.

Kemirgenler üzerinde yapılan cerebral İ-R model çalışmalarında oluşan hasarın; iskemi ve reperfüzyon sürelerine, iskeminin şiddetine göre değiştiği pek çok kere gösterilmiştir (25,109). İskemi süresi kısa iken reperfüzyon hasarının az olduğu, süre uzatıldığında hasarın ve buna bağlı olarak enfarkt hacminin arttığı gösterilmiştir (110).

Sıçanlarda oluşturulan cerebral İ-R modeli çalışmalarında iskemi süresi 5-30 dk. arası değişmekte, reperfüzyon süreleri ise incelenecek parametrelere göre belirlenmektedir (94).

Çalışmamızda sıçanlara tek taraflı ACC'e klemp takarak 15 dk. boyunca iskemi oluşturduk, daha sonra 24 saatlik reperfüzyon süresi bitiminde kan ve doku örnekleri alınarak SOD, CAT ve MDA analizleri yapıldı.

Serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulduğu durumda oksidatif stresin olduğu bilinmektedir. Hasarın hem biyokimyasal hem de morfolojik olarak gösterildiği durumlarda antioksidan kapasitedeki değişimler araştırılmaktadır. Bu nedenle antioksidan sistemin önemli bileşenleri olan SOD ve CAT düzeylerinin incelenmesi sonucu serbest radikal aracılı hasar konusunda indirek bilgi verir (52, 91,107).

Farklı hastalıklarda oluşan SOR üretiminde ve antioksidan enzim aktivitesinde giderek artan bir artış gözlemlenmek söz konusu değildir. Organizma antioksidan savunma sistemlerini en uygun şekil ve

yöntemlerle çalıştırıp en yararlı savunmayı seçmek, hastalığın türüne veya tipine en uygun antioksidan sistemini çalıştırmak veya enzim sentezini engellemek yahut da enzim yapısını değiştirmek yöntemlerinden biriyle baskı altına alınır (59).

Aldığımız kan örnekleri üzerinde yaptığımız SOD analizi sonucu; iskemi uyguladığımız, ancak madde vermediğimiz Sham grubu değerinin en düşük düzeyde olduğu gözlenmiştir. Bu durum, iskemi ile birlikte artış gösteren serbest radikaller karşısında antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığını göstermektedir.

ASX25mg/kg grubu değerlerinin anlamlı bir şekilde artması verdiğimiz maddenin (ASX'in) anlamlı bir şekilde antioksidan sistem üzerinde koruyucu etki yaptığını göstermektedir. ASX75mg/kg grubunda da koruyucu etki artarak Kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır. Ancak verilen maddenin dozundaki artış, ASX25 mg/kg grubunun koruyucu etkisi oranında artış göstermemiştir. Bu durum ASX'in artan dozla birlikte koruyucu etkisinin de artmaya devam ettiğini, ancak hızının giderek azaldığını bildirmektedir.

Hücrenin doğal yapısı içinde mitokondride yer alan ve endojen antioksidan enzimlerden biri olan SOD, serbest radikallerin temizlenmesinde görev alır. Bir başka adıyla serbest radikal süpürücüsüdür. Cerebral iskemi sırasında/sonrasında oluşan süperoksit radikallerini, daha az reaktif olan ve serbest radikal olmamasına rağmen ROS kapsamında sayılan H₂O₂ kalıbına döndürür. Sıçanlarda deneysel serebral İ-R sonrası SOD aktivitesinin düştüğünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır (40).

SOD'un nötralize edilmesinde, tanımını yaptığımız serbest radikaller doğrudan etkisi bulunmaktadır. SOD'un aktivitesindeki azalmayı açıklamakta ve oksidatif stresin arttığını göstermekte, önemli bir kaynak ve çıkış nedenidir. SOD gibi oksidatif hasara maruz kalmış enzimler proteinleri amino asitlere kadar parçalamak eğilimindedirler ve bu süreç içinde yitime uğrarlar. SOD aktivitelerinin düştüğü gözlenmektedir.

Gerbillerde yapılan deneysel bir çalışmada da 15 dk. iskemiye takip eden 1. ve 2. reperfüzyon günlerinde SOD düzeyinde düşüş olduğu gösterilmiştir (94).

Çalışmamızda CAT değerleri genel olarak SOD değerleriyle benzerlik gösterdiği izlendi. Sham grubuna ait CAT değerlerinin Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, iskemi ile birlikte artış gösteren serbest radikaller karşısında antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığını göstermektedir.

ASX25mg/kg grubu değerlerinin anlamlı bir şekilde artması verdiğimiz maddenin (ASX'in) anlamlı bir şekilde antioksidan sistem üzerinde

koruyucu etki yaptığını, ASX75mg/kg grubunda ise koruyucu etkinin artarak devam ettiği ve Kontrol grubu değerlerine iyice yaklaştığı gözlenmiştir.

ASX'in doz miktarının 85-90mg/kg düzeyine çıkarılması durumunda CAT değerleri açısından antioksidan savunma sistemi üzerinde tam (%100) koruyucu etki sağlayacağı düşünülmektedir.

Hücre hasarına eşlik eden temel mekanizma SOR'a bağlı lipid peroksidasyonudur. Kan ve doku örneklerinde lipid peroksidasyonun belirlenmesinde MDA analizi yapıldığı ve MDA'nın oksidatif hasarın majör göstergesi olduğu belirtilmiştir (1).

Çalışmamız sırasında oluşan hasarı ve ASX'in bu hasar üzerindeki etkisini göstermek için MDA düzeylerini inceledik. Sham grubu MDA değerleri Kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bu durum iskemi sonrası cerebrum'da hasarın oluştuğunu göstermektedir.

ASX25mg/kg grubu değerlerinin hızla düşmesi ve Kontrol grubu değerlerine yaklaşması verilen maddenin (ASX) beyin üzerinde anlamlı bir şekilde koruyucu etki yaptığını göstermektedir.

ASX75mg/kg Grubu değerlerinin Kontrol grubu değerlerinin altına düşmesi ASX'in beyin üzerinde tam (%100) koruyucu etki yaptığını göstermektedir.

Bu bulgular neticesinde ASX'in antioksidan sistem ve cerebrum üzerinde anlamlı düzeyde koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Farklı bir çalışmada bulduğumuz verilerin aksine kontrol grubu MDA düzeylerinin sham grubu MDA düzeylerine göre önemli şekilde yüksek olduğu belirtilmiştir (6, 96). Başka bir çalışmada ise ön cerebral İ-R'de cerebral doku ve kanda MDA seviyelerinin önemli şekilde arttırdığı rapor edilmiştir.

Ancak bunların yanında Yaidikar ve ark. yaptığı bir çalışmada flavonid kullanımının cerebral iskemi hasarında MDA üretiminin baskılama suretiyle doku koruyucu etkisini ortaya koymuş olmaları, bizim araştırmamız sonucu bulduğumuz verileri destekler niteliktedir (113).

Gupta ve ark. yaptıkları çalışmalarda bulgularda oksidatif hasarın arttığını göstermişlerdir (39). Yaptıkları çalışmalarında a. cerebri media oklüzyonu oluşturulmuş sıçanlarda MDA düzeylerinde anlamlı bir artış tespit etmişler. Bu tespitleriyle a. cerebri media oklüzyonu oluşturulmuş sıçanlarda serbest oksijen radikallerinin artışına bağlı oksidatif hasar oluştuğunu göstermişlerdir. Sugawara ve ark. da benzer şekilde deneysel iskemi de H₂O₂ ve lipid hidroperoksitin arttığını göstermişlerdir (98).

Yirmi dakika global cerebral iskemi oluşturulan başka bir çalışmada da reperfüzyonun 7. gününde uzaysal hafızadaki bozulmayla birlikte lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyinde artış saptanmıştır (114).

ASX; cerebrum, karaciğer, üreme sistemi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. ASX'in cerebrum'da kan-beyin bariyerini geçebiliyor oluşu özellikle cerebral iskemi üzerine yapılan çalışmalarda daha çok tercih edilmesi sonucunu doğurmuş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (15,39,115).

ASX'in koruyucu etkisi birçok iskemik doku ve organ üzerinde araştırılmıştır. Böbreklerde meydana gelen oksidatif stres ile doku hasarı ve diğer böbrek bozukluklarında ASX'nin etkili olacağını işaret eden çalışmalar mevcuttur. ASX'in karaciğerde oluşturulan İ-R hasarı üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile yaptıkları çalışmalarda İ-R uygulamasından önce 14 gün boyunca ASX verildiğinde İ-R'nin karaciğerde oluşturduğu oksidatif hasarı önlediğini göstermişlerdir (11).

Nakajima ve arkadaşlarının yaptığı incelemede retinal hücrelerde SOR'un etkili olduğu ve başlattığı oksidatif stres yanında lipid peroksidasyonu, ayrıca DNA hasarı üzerinde ASX'nin koruyucu etki yaptığını tespit etmişlerdir. Tespitlerinin bir sonucu olarak ASX'nin retinal bozukluklarda etkin bir tedavi edici ilaç olarak kullanılabileceğini önermişlerdir (78).

In vivo cerebrum merkezli iskemi ve in vitro H₂O₂'nin nörotoksitesi üzerine yaptıkları çalışmalarında, ASX'i iskemiden 1 ve 5 saat önce olmak üzere 2 defa verdiklerinde ASX'in koruyucu olduğunu belirlemişlerdir.

ASX; vücut sıcaklığı, cerebrum sıcaklığı, cerebral kan akışı, kan basıncı, kan pH'sı gibi fizyolojik parametreleri düzenleyemez, fakat beyin dokusunda oluşan oksidatif stresi, glutamat salınımını ve apoptozisi azaltabilir. Nitekim Lee D.H. ve arkadaşları, Shen H. ve arkadaşları, genç sıçanlar üzerinde oluşturdukları iskemik cerebral hasarın ASX ile azaltılabildiğine dikkat çekmişlerdir. Ancak nöral dejenerasyonlarının görüldüğü Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklarda ASX'nin olumlu etkilerinin olup olmadığının ortaya konulabilmesi için daha ileri düzeyde çalışmaların yapılması gerekli ve zorunludur (63,97).

ASX'in intraserebroventriküler uygulandığı subaraknoid hemoraji oluşturulan ve erken cerebral hasar üzerine etkilerinin incelendiği Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında da TUNEL yöntemiyle apoptoz değerlendirme sonuçlarında değişik dozlara cevaben azalmış apoptoz oranı tespit edilmiştir (118).

Cerebral iskemi sonucunda hücre nekrozuna sebebiyet veren olaylar, hücre içindeki diğer bazı faaliyetler gibi henüz tam anlaşılammıştır. Çağımız teknolojisinin son yıllarda tıp alanında devrim niteliğindeki

atılımlarına rağmen, insan organizmasının mikro ve makro düzeyde bilinmeyenleri sayısal olarak şaşırtıcı düzeyde fazladır. Ancak son yıllarda tıp alanındaki bulgular olağanüstü şekilde hız kazanmış ve kat edilen mesafe olağanüstü boyutlara varmıştır.

Cerebral İ-R'nin nöronlar üzerindeki etkisinin gözlemlenebilmesi amacı ile cerebral iskemi çalışmalarında yaygın olarak hematoksilen eozin boyaması yapılmaktadır (29).

Çalışmamızda cerebral doku kesitleri HE ile boyanarak değerlendirildi. Sham grubunun cerebral korteksinde yoğun hasar ve çok sayıda nekrotik nöron gözlemlendi. Bu sonuçlar yaptığımız çalışmada a. carotis communis iskemi-reperfüzyon modelini uygulayarak sham grubunda cerebral İ-R hasarı oluşturduğumuzu göstermektedir.

ASX uygulanan deney hayvanlarında ise cerebral korteksde Sham grubuna göre azalmış hasar ve nekrotik nöronlarda azalma gözlemlenmiştir. Bu da bize ASX'in hasarı anlamlı düzeyde azaltabileceğini, bu yüzden de koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

6- SONUÇ ve ÖNERİLER

Metabolizma, canlı organizma içinde gerçekleşen çeşitli kimyasal reaksiyonları kapsar. Bu reaksiyonlardan biri de oksidasyondur. Organizmada oksidanlar ile antioksidanlar denge hâindedir. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucunda oksidanların sayısında meydana gelen artış birçok rahatsızlığa sebep olabilir. Oksidanlar içinde serbest radikaller olduğu gibi olmayanlar da vardır. Serbest radikal üretimine yol açarak ya da antioksidan sistemlerini inhibe ederek oksidatif strese neden olan moleküllere pro-oksidan denir. Her hastalığın temelinde belli bir ölçüde oksidatif stresin etkili olduğu kabul edilmektedir.

Hücrel faaliyetler sonucunda artan serbest radikal üretimi iç ve dış etkenler sonucunda artar. Bu artış oksidan savunma sisteminde bir dengesizliğe sebep olur ve oksidanların artışı sonucunu doğurursa meydana gelen oksidatif stres hastalıkların temel nedenini oluşturur. Enzimatik olan yahut olmayan antioksidanların sayısında artış da oksidatif stresi meydana getirir. Bu da çok sayıda hastalığın temel dayanağını oluşturur. Hücrelerin lipit ve protein yapıları ile DNA'ları üzerinde toksit etkilerin görülmesinin ana sebebi budur.

Serbest radikallerle çevrenin birbiriyle iletişimi ve ilgisi her zaman önemli olmuştur. Çünkü çevreden yayılan gazlar, kirletilmiş ve risk taşıyan sular, yaşadığımız ortamda değişik oranlarda bulunan çeşitli kimyasal bileşikler, tek başına ya da birkaçı birbiriyle etkileşime girerek insan sağlığını ciddi boyutlarda tehdit eder ve risklerin büyümesi sonucunu doğurur. Bunlar sadece insanlar için değil, diğer canlılar için başlı başına tehdit kaynağıdır. Bunların artması sonucunda antioksidan savunma sistemi etkisini yitirir ve görevini yapamaz hâle gelir. Böylece serbest radikallerin aşırı ve sık saldırılarına maruz kalması sonucu birçok hücre, doku, organ ve sistemler birbirine bağlı olarak aynı zamanda etkilenmektedir.

Organizmada bozulan oksidan ve antioksidan denge iç ve dış etkenlerin artan etkisiyle serbest radikallerin üremesini şaşkınlık verecek boyutlarda hızlandırır ve yukarıda sıraladığımız hasarlara neden olur. Bu durum da öncelikle henüz başa çıkmadığımız kanseri tetikler. Ayrıca yine başta serebrovasküler ve kardiovasküler hastalıklar olmak üzere organizmanın dengesini bozan birçok hastalığın oluşmasına sebebiyet verir. Sorunlar katlanarak büyüme eğilimi gösterir.

Giderek üreyen, üredikçe daha da artan serbest radikallerin hedefinde hücreler vardır. Hücrelere birbiri ardına yaptıkları saldırılar hiç bitmez. Serbest radikallerin saldırısına tutulan hücreler yaşam uğraşı verir. Bir insan vücudundaki bir hücrenin günde defalarca amansız bombardımana uğraması karşısında hücrenin canlılığını koruması kolay değildir. Bu durumda öncelikle organizmanın geliştirdiği savunma sistemlerinden

antioksidan savunma sistemi devreye girerek hücreleri muhtemel bir hasardan korur. Savunma sisteminin hedefinde de serbest radikaller vardır. Onları tutar, hızlarını keser yani aktivitelerini denetim altında tutar, yapılarını değiştirerek zararsız hâle getirir, yahut girdiği kimyasal reaksiyonlarla onları organizmanın kaldırıp atacağı bir yapıya dönüştürür. Ancak tüm bunlar yeterli olmayıp serbest radikaller yine de etkinliğini sürdürebilirler. Bu durumda dışarıdan alınacak besinlerle antioksidan savunma sisteminin gücünü artırmak zorunlu hâle gelecektir.

Çalışmamızda uyguladığımız cerebral iskemi modelinin İ-R hasarı oluşturmada başarılı olduğu gözlenmiştir. Histolojik bulgular sonucunda iskemi uyguladığımız grubun cerebral doku örneklerinde yoğun hasar ve nekrotik hücreler gözlenmiştir.

Madde verilen deneysel gruplardaki doku örneklerinde azalmış hasar ile az sayıda nekrotik hücreler gözlenmiştir. Bu da bize antioksidan olarak verilen ASX'in cerebral doku üzerinde İ-R hasarına karşı kısmî koruyucu etki sağladığını göstermektedir.

Biyokimyasal analizler sonucunda SOD ve CAT değerlerinde iskemi uyguladığımız grubun anlamlı düzeyde düşük olduğu gözlendi. Bu da bize iskemi ile artış gösteren serbest radikaller karşısında antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığını göstermektedir.

Madde verilen deneysel grupların SOD ve CAT değerleri anlamlı bir şekilde artış gösterdiği gözlenmiştir. Bunun sonucunda kullandığımız ASX'in antioksidan savunma sistemi üzerinde koruyucu etki sağladığı gözlenmiştir.

Oksidatif hasarın belirteçlerinden biri olan MDA değerlerinin iskemi uygulanan grupta anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum iskemi sonrası cerebrumda hasar oluştuğunu göstermektedir. Madde uyguladığımız deneysel gruplarda MDA değerlerinin anlamlı düzeyde azaldığı, hatta yüksek doz (ASX75mg/kg) uyguladığımız gruptaki değerlerin kontrol grubundaki değerlerin de altına indiği gözlenmiştir. Bu durum ASX'in oksidatif hasara karşı beyin üzerinde anlamlı düzeyde koruyucu etki sağladığını, yüksek dozda ise tam koruyucu etki sağladığını göstermektedir.

Tüm bu bulgular sonucunda ASX'in cerebral iskemi modeli uygulanan sıçanlarda antioksidan sistem ve beyin üzerinde İ-R hasarına karşı koruyucu etki sağladığını göstermektedir.

Oksidatif hasara karşı ASX'in histolojik bulgular ile biyokimyasal sonuçlar arasında az da olsa fark görülmesinin sebebi: MDA ölçümü yapabilmek için TBA ile MDA'nın reaksiyona girmesi gerekmektedir. Bu reaksiyon nedeniyle MDA değerlerinin değişik çıkabileceği bildirilmektedir.

Çalışmamızda görülen farkın da bundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

ROT'in hücre sel yapı lar üzerindeki etkisi konusunda birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen, bu konular çoğu hastalıkların patogenezi ile ilişkili bulunması sebebiyle hâlen gündemde kalmaya devam etmektedir. Bu konular hakkında, daha etkin ve geniş boyutlu çalışmalar yapılmasını, gelecekte hastalıkların patogenezi ni anlamada ve toplumu aydınlatmada daha etkin ve önemli rol oynayacağı nedeniyle önermekteyiz.

Antioksidan maddeler ile ilgili yapılacak araştırmalarda:

- Antioksidan yönünden zengin olan besinlerin ve bunların beslenme üzerindeki etkilerinin anlatılması,
- Antioksidan yönünden zengin besinler içeren gıdaların günlük dozları ile kullanma zamanlarının bilimsel olarak belirlenmesi,
- Antioksidan içeren besinlerin biyoyararlanımlarının bilimsel yöntemlerle tespit edilmesi,
- Antioksidan yönünden zengin besinlerin birlikte yahut periyodik olarak kullanılan ilaçlarla birlikte alınması sonuçlarının araştırılması,
- İlaçlarla antioksidan besinlerin etkilerinin azalması ya da ortadan kalkması (antagonizma) veya etkisinin artması (sinerjizma) durumlarının bilimsel verilerle ortaya konulması, çalışmalarını daha cazip hâle getireceği nedeniyle önermekteyiz.

Sunulan bilgiler çerçevesinde:

- Piyasada sürüm hâlinde bulunan vitamin tabletleri yerine onlardan antioksidan olarak daha zengin olan besinleri düzenli bir şekilde tüketmenin sağlık yönünden daha uygun ve yararlı sonuçlar vereceğinin kamuoyuyla paylaşılması,
- Yapılacak bilimsel nitelikli çalışmaların yararlı ve kesin sonuçlarının kamuoyuna bildirilmesi,
- Doğal beslenme yoluyla hastalıklardan korunmada, yeni bilgilerin en kısa ve en etkin iletişim yoluyla paylaşılması; az bilinen ya da bilinmeyen gerçek bilgilerin yaşama geçirilmesinde katkı sağlayacağı düşüncesiyle önerilmektedir.

Yapılan çalışmalarda doğru deneysel modelin seçilerek uygulanması en önemli parametrelerden biridir.

A. carotis communis iskemi-reperfüzyon deneysel modelinde karşılaşılan en büyük sorun, ortaya çıkan sonuçların değişkenliğinin denetlenmesinde yaşanmaktadır. Eğer yeterli denetim yapılmamışsa farklı parametrelerin artmasına bağlı olarak değişkenliğin artması uygulanan modelin geçerliğine ve güvenilirliğine gölge düşürmektedir. Değişkenler arasında yer alan; plazma glukoz konsantrasyonu, sıcaklık, kan basıncı ve kan gazları, ayrıca; yaş, cinsiyet, ırk gibi değişiklikler yanında cerrahi işlemlerin tekrarlanabilmesi, hayvanların boyutları ve maliyetleri gibi değişkenler de deneysel modelin seçimini etkilemektedir. Daha sonra gerçekleştirilecek araştırmalarda İ-R süresindeki değişimlerle birlikte kullanılacak farklı dozların serebral infarkt alanına olan etkisinin de belirlenmesi doku düzeyinde oluşan hasarda bu ilacın etkinliğinin daha iyi bir şekilde ortaya konulmasını sağlayacağı için önerilmektedir.

Histolojik bulguların değerlendirilmesinde daha objektif sonuçlara ulaşmak için, tespit edilen değişimlerin gruplandırılmasının yanında, nicel değerlendirmeler yapılması daha kesin sonuçlara ulaşmada yardımcı olmaktadır.

ASX'in antioksidan sistem ve cerebrum üzerindeki koruyucu etkisini daha gerçekçi ve bilimsel bir şekilde ortaya koyabilmek için:

- Gelecek çalışmaların daha fazla deney grupları ile yapılması,
- Farklı sürelerde farklı uygulamaların kullanılması önerilmektedir.

Sunduğumuz bu önerilerin dışında iki ayrı öneri daha sunmak isteriz:

1-Nobel Ödülü sahibi Prof. Dr. Aziz Sancar: "Bilimsel hayatım boyunca üzerinde sürekli çalıştığım konu Deoksiribonükleik asit (DNA) onarımı olmuştur." demiştir.

- Bu açıklama DNA'lar hakkında öğrenmemiz gereken çok şeyin olduğuna işaret eder. DNA yanında Ribonükleik asit (RNA) de birlikte, insanın geçmiş ve geleceğiyle ilgili bilgiler konusunda olağanüstü imkânlar sunmaktadır.
- Oksidatif hasarlarla bunların sonucu oluşan hastalıklar bilindiği oranda önlem alınacaktır. Bu nedenle incelemelerin daha önemli yararlar üretebilmesi için yaptığımız türden araştırmaların DNA ve RNA alanına, ayrıca son yılların çalışmalarından olan proteomik teknolojisi alanına da kaydırılması önerilmektedir.

2-Serbest radikallerin yaşlılığın ana nedenlerinden biri olduğunun bilimsel kuram olarak öne sürülmesi henüz 62 yıllık bir geçmişe sahiptir!.. Serbest radikallerle yaşlılık arasındaki ilişkinin boyutları henüz tam

bilinmediğinden bu kuram kesin kabul görmüş değildir!..

- Genelde yaşlanmak istemeyen insanlığın araştıracağı önemli konulardan biri de serbest radikal ve çevresinde bulunan tüm işlev, reaksiyon ve etkileşim alanı olacaktır.
- Bu nedenle yaptığımız türden çalışmaların **yaşlılık eksenini** **etrafında;** serbest radikaller, antioksidanlar, DNA, RNA ve protein ağırlıklı olması önerilmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abdel-Salam, O.M., Youness, E.R., Mohammed, N.A., Abd-Elmoniem, M., Omara, E. and Sleem, A.A. (2012). *Neuroprotective and hepatoprotective effects of micronized purified flavonoid fraction in lipopolysaccharide-treated rats. Drug Discov Ther, 6(6):306-14.*
2. Acarkan, T. (2013). *Latent asidoz. Barnat, 17:18-24.*
3. Aebi, K., Satoshi, Y., Kogure, K. (1988). *Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. Stroke, 19:480-5.*
4. Akkuş, I. (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.*
5. Aksoy, Y. (2002). *The role of glutathione in antioxidant mechanism. T Klin J Med Sci, 22:442- 448.*
6. Aras, M., Altaş, M., Meydan, S., Nacar, E. and Karcioğlu, M. (2014). *Effects of ebselen on ischemia/reperfusion injury in rat brain. Int J Neurosci, 124(10):771-6.*
7. Ayala, A., Muñoz, M.F. and Argüelles, S. (2014). *Lipid peroxidation: production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev, 360438.*
8. Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M. and Arad, S., (1995). *Pigment and structural changes in Chlorella zofingiensis upon light and nitrogen stress. Journal of Plant Physiology, 146:527–534.*
9. Bast, A., Haenen, G. and Goelmen, J.A. (1991). *Oxidants and antioxidants: State of the art. Am J Med, 91(3 Suppl 3):2-13.*
10. Betteridge, D.J. (2000). *What is oxidative stress? Metabolism, 49(2 Suppl 1):3-8.*
11. Boys, J.A., Toledo, A.H., Anaya-Prado, R., Lopez-Neblina, F., Toledo-Pereyra, L.H. (2010). *Effects of dantrolene on ischemia-reperfusion injury in animal models: a review of outcomes in heart, brain, liver, and kidney. Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research, 58(7):875-882.*
12. Burtis, C.A., Ashwood, A.R. and Bruns, D.E. (2006). *Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. St Louis Elsevier Saunders.*

Kaynaklar Dizini Devami

13. Cadenas, E. and Sies, H. (1998). *The lag phase. Free radic res. 28(6), 601-609.*
14. Chae, H.Z., Kang, S.W. and Rhee, S.G. (1999). *Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. Methods Enzymol, 300, 219-226.*
15. Chen, H. and Tappel, A.L. (1996). *Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidation induced by CBrCl₃ in liver, lung, kidney, heart, and spleen. J. Agric. Food Chem. 44(3);854- 858.*
16. Chen, Y., Li, D., and Lu, W. (2003). *Screening and characterization of astaxanthin-hyperproducing mutants of Haematococcus pluvialis. Biotechnology Letters, 25:527-529.*
17. Cohen, Z.V. (2000). *Chemicals from microalgae. Taylor & Francis publishers, 419.*
18. DeGracia, D.J., Kumar, R., Owen, C., Krause, G. and White, B.C. (2002). *Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 22:127-141.*
19. Denizci, A.A. (1990). *Phaffia Rhodozyma Mayası ile Astaksantin pigmentinin üretimi ile ilgili bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir.*
20. Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., ve ark. (2004). *Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J Assoc Physicians India, 52, 794-804.*
21. Diplock, A. (1998). *Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, 59.*
22. Droge, W. (2002). *Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev, 82(1), 47-95.*
23. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW. (1996). *Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? J Cereb Blood Flow Metab, 16:195-201.*
24. Duthie, G.G., Wahle, K.W.J. and James, W.P.T. (1989). *Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. Nutr. Res. Rev, 2; 51-62.*

Kaynaklar Dizini Devamı

25. Earnest MP, Yarnell PR, Merrill SL, Knapp GL. (1980). *Long-term survival and neurologic status after resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest. Neurology, 30:1298-1302.*

26. Ertan, T., Soran, A., Kılıc, M., Aşlar, A.K., Koc, M. and Cengiz, O. (2001). *Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin (TAS) önemi. Cerrahi Tıp Bülteni, 2:4:154-67.*

27. Fabregas, J., Dominguez, A., and Otero A., (2001). *Two-stage cultures for the production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis. Journal of Biotechnology, 89: 65-71.*

28. Fang, Y.Z., Yang, S. and Wu G. (2002). *Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition, 18(10), 872-879.*

29. Filipisky, T., Ríha, M., Macakova, K., Anzenbacherova, E., Karlickova, J. and Mladenka, P. (2015). *Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging, metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes. Curr Top Med Chem, 15(5):415-31.*

30. Flora, S.J. (2007). *Role of free radicals and antioxidants in health and disease. Cell. Mol. Biol, 53(1), 1-2.*

31. Foss, P., et al. (1987). *Natural occurrence of enantiomeric and meso astaxanthin in crustaceans including zooplankton. Comp. Biochem. Physiol, 86B: 313-314.*

32. Fujii, J., Iuchi, Y. and Okada, F. (2005). *Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. Reprod Biol, 3:43.*

33. Grace, P.A. (1994). *Ischaemia-reperfusion injury. British J of Surgery, 81:637-47.*

34. Girotti, A.W. (2000). *Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res, 39:1529-42.*

35. Görmüş, Z.I., Ergene, N., Toy, H., Baltacı, A.K. and Mogulkoc, R. (2009). *Preventive role of magnesium on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury-an experimental study. Biological trace element research, 127(2):183-189.*

36. Grisham, M.B. and Granger, D.N. (1989). *Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. Clin Chest Med, 10(1):71-81.*

Kaynaklar Dizini Devami

37. Grung M., Borowitzka, M., and Jensen, S., (1992). *Algal carotenoids, 1. Sekondary carotenoids, 2. Haematococcus pluvialis aplanospores as a source of (3S-3'S)-astaxanthin esters. J. Appl. Phycol, 4:165-171.*
38. Guerin, M., Huntley, M.E. and Olaizola, M., (2003). *Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends in Biotechnology, 21:210-216.*
39. Gupta, Y.K. and Briyal, S. (2004). *Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. Indian J Physiol Pharmacol, 48(4):379-94.*
40. Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. (2010). *Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. Biochemical and biophysical research communications, 393(4):561-564.*
41. Hagen, C., Grünewald, K., and Rothe, E., (2001). *Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of Haematococcus pluvialis. Journal of Applied Phycology, 13:79-87.*
42. Halliwell, B. (1999). *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). Free Radic Res, 31(4), 261-272.*
43. Harukuni, I. and Bhardwaj, A. (2006). *Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. Neurol Clin, 24(1):1-21.*
44. Hata, N., Ogbonna, J., and Hasegawa, Y. (2001). *Production of astaxanthin by Haematococcus pluvialis in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. Journal of Applied Phycology, 13: 395-402.*
45. Herbert, K.J., Hickey, M.J., Lepore, D.A., Knight, K.R., Morrison, W.A. and Stewart, A.G. (2001). *Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischaemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. Eur J Pharmacol, 424: 59-67.*
46. Jiang, F., Guo, N. and Disting, G.J. (2008). *Modulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase expression and function by 3',4'-dihydroxyflavonol in phagocytic and vascular cells. J Pharmacol Exp Ther, 324(1):261-9.*
47. Johnson, E.A. and An, G.H. (1991). *Astaxanthin from microbial sources. Critical Reviews in Biotechnology, 11:297-326.*

Kaynaklar Dizini Devamı

48. Johnson, E.A., and Schroeder, W.A. (1996). *Biotechnology of astaxanthin production in Phaffia rhodozyma. Biotechnol. Improved Food Flavors*, 637:39-50.

49. Inbarr, J. (1998). *Haematococcus, The poultry pigmentor. Feed Mix*, 6:31-34.

50. Karakan, M. ve Nazlıkul, H. (2017). *Oksidatif stres ve serbest radikallerin vücut üzerindeki etkisi. Bilimsel tamamlayıcı tıp, regülasyon ve nöralterapi dergisi*. 11;2:7-11.

51. Kalyanaraman, B. (2013). *Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. Redox Biology*, 244-257.

52. Khan, M.M., Ahmad, A., Ishrat, T., Khuwaja, G. et al. (2009). *Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. Brain Res*, 1292:123-135.

53. Kirino, T., Tamura, A. and Sano, K. (1984). *Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. Acta Neuropathol*, 64:139-147.

54. Kopáni, M., Celec, P., Danisovic, L., Michalka, P. and Biró C. (2006). *Oxidative stress and electron spin resonance. Clin Chim Acta*, 364:61-66.

55. Korthuis, R.J. and Granger, D.N. (1993). *Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. Clinical cardiology*, 16(4 Suppl 1):19-26.

56. Krino, T., Tamura, A. and Sano, K. (1995). *Selective vulnerability of the hippocampus to ischaemia-reversible and irreversible types of ischaemic cell damages. Prog Brain Res*, 63:39-58.

57. Kumar, V., Cotran, R. and Robbins, S.L. (2000). *Basic Pathology. 6th edition*, 6-10,30-36

58. Kutluk, K. (2004). *İskemik inme. İn:Kutluk K. Patogenez. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul*, 19-35.

59. Kuzume, Ko., Kuzume, Ka., Wolff, R., Chien, G. and Winkle, D.M. (2004). *Remifentanil limits infarct size but attenuates preconditioning-induced infarct limitation. Coronary Artery Disease*, 15:449-458.

Kaynaklar Dizini Devamı

60. Larson, R.A. (1988). *The antioxidants of higher plants. Phytochemistry, 27(4); 969-978.*

61. Lavelli, V., Peri, C. and Rizzola, A. (2000). *Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. J. Agric. Food Chem, 48(5); 1442-1448.*

62. Lee, S.J., Bai, S.K., Lee, K.S. et al. (2003). *Astaxantin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. Mol Cells, 31;16(1):97-105.*

63. Lee, D.H., Lee Y.J. ve Kwon, K.H. (2010). *Neuroprotective Effects of Astaxanthin in Oxygen-Glucose Deprivation in SH-SY5Y Cells and Global Cerebral Ischemia in Rat. J Clin Biochem Nutr, 47(2):121-9.*

64. Lin, E., Lowry, S.F. and Calvano, S.E. (1999). *The systemic response to injury. Schwartz SI, Principles of Surgery. Mc Graw-Hill 7th Edition, I:13-32.*

65. Lipton, S.A. (1999). *Redox sensitivity of NMDA receptors. Methods Mol Biol, 128:121-130.*

66. Lipton, P. (1999). *Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev, 79:1431-1568.*

67. Longa, Z., Weinstein, P.R., Carlson, S. and Cummins, R. (1989). *Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke, 20:84-91.*

68. Lopez-Neblina, F., Toledo, A.H. and Toledo-Pereyra, L.H. (2005). *Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. J Invest Surg, 18:335-350.*

69. Lorenz, T. (1999). *A technical review of Haematococcus algae. Naturose Technical Bulletin, 060:9.*

70. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C. (2005). *Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem, 16:577-586.*

71. Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I. (1999). *Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochem, 32(8):595-603.*

Kaynaklar Dizini Devami

72. McGee-Russell, S.M., Brown, A.W. and Brierley, J.B. (1970). *A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischaemic cell change in rat brain. Brain Res, 20:193-200.*

73. Meydani, M. (2001). *Antioxidants and cognitive function. ILSI. Nutrition Reviews, 59(8):S75-82.*

74. Michalik, L. and Wahli, W. (2006). *Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. J Clin Invest, 116:598-606.*

75. Miller, D.D. (1996). *Minerals. In:Food Chemistry, O.R. Fennema, Marcel Dekker, New York, 617-649.*

76. Mogulkoc, R., Baltaci, A.K., Oztekin, E., Aydin, L. and Sivrikaya, A. (2006). *Melatonin prevents oxidant damage in various tissues of rats with hyperthyroidism. Life Sci, 79(3):311-5.*

77. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. (2004). *Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem, 279(47):49064-49073.*

78. Nakajima, Y., Inokuchi, Y., Shimazawa, M., Otsubo, K., Ishibashi, T. and Hara, H. (2008). *Astaxanthin, a dietary carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress in-vitro and in mice in-vivo. J Pharma Pharmacol, 60(10):1365-74.*

79. Nawar, W.W. (1996). *Lipids. In:Food Chemistry, O.R. Fennema, Marcel Dekker, New York, 225-319.*

80. Nazlıkul, H. (2006). *Anti Aging Nedir? Anti Aging ne yapmalı ve nereden başlamalıyız? Barnat, 4:8-17.*

81. Nazlıkul, H. (2010). *Nöralterapi, bölüm VII Nöralterapi. Nobel, 137-157.*

82. Nazlıkul, H. (2013). *Hayatı Keşfet, Serbest Radikaller ve Serbest Oksijen Radikalleri. Alfa, 217.*

83. Noiri,E., Nakao, A., Uchida,K., Tsukahara,H., Ohno,M., Fujita,T., Brodsky,S., & Goligorsky M,S., (2001). *Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. Am J Physiol Renal Physiol, 281:F948-957.*

84. Onat, T., Emerk K. ve Sözman E. (2006). *İnsan Biyokimyası, 2. Baskı, Palme Yayıncılık.*

Kaynaklar Dizini Devami

85. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., and Deemer, E.K. (2002). *Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays:A comparative study. J. Agric. Food Chem, 50(11):3122-3128.*
86. Ozan H. (2014). *Ozan Anatomi. 3.Baskı. Ankara:TUSDATA.*
87. Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huyc, C. (2008). *Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. Int J Biomed Sci, 4(2),89-96.*
88. Porter, N.A. (1985). *Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. In:Chemical Changes in Food During Processing, 73-105.*
89. Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B. and Barlow-Walden, L. (1995). *A review of the evidence supporting melatonins role as an antioxidant. J Pineal Res, 18:1-11.*
90. Rhodes RS, DePalma RG. (1980). *Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. Surg Gynecol Obstet, 150:347-52.*
91. Saleem, S., Ahmad, M., Ahmad, A.S., Yousuf, S. et al. (2006). *Behavioral and histologic neuroprotection of aqueous garlic extract after reversible focal cerebral ischemia. J Med Food, 9:537-544.*
92. Sanders, R., Daqing, Ma. and Maze, M. (2005). *Anaesthesia induced neuroprotection. Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology, 1:461-47.*
93. Sarma, A.D., Mallick, A.R. and Ghosh, A.K. (2010). *Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. Int J Pharm Sci Res, 1(3),185-192.*
94. Selakovic, V., Korenic, A. and Radenovic, L. (2011). *Spatial and temporal patterns of oxidative stress in the brain of gerbils submitted to different duration of global cerebral ischemia. Int J Dev Neurosci, 29(6):645-54.*
95. Semenza, G.L. (2000). *Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. Circ Res, 86:117-118.*

Kaynaklar Dizini Devamı

96. Shao, A., Guo, S., Tu, S., Ammar, A.B., Tang, J. and Hong, Y. (2014). *Astragaloside IV alleviates early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. Int J Med Sci, 11(10):1073-81.*
97. Shen, H., Kuo C.C., Chou, J., Delvolve, A., Jackson, S.N., Post, J., Woods, A.S., Hoffer, B.J., Wang, Y. and Harvey, B.K., (2009). *Astaxanthin Reduces Ischemic Brain Injury in Adult Rats. FASEB J, 23(6):1958-68.*
98. Sugawara, T., Fujimura, M., Noshita, N., Whan, G. and Saito, A. (2004). *Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 1:17-25.*
99. Sener, G., Sakarcan, A. and Yegen, B.C. (2007). *Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. Mol Nutr Food Res, 51:1345- 1352.*
100. Şener, G. ve Yeğen, Ç.B. (2009). *İskemi Reperfüzyon Hasarı. Klinik Gelişim, 22(3):5.*
101. Şener, G. (2010). *Karanlığın hormonu: Melatonin. Marmara Eczacılık Dergisi, 14:112-120.*
102. Toole, J.F. and Burrow DD. (1990). *Pathophysiology and Clinical Evaluation of Ischemic Vascular Disease. In Youmans JR: Neurological Surgery, 1463 -1515.*
103. Tullis, M.J., Brown, S. and Gewertz, B.L. (1996). *Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. J Surg Res, 66:143-6.*
104. Türkiye İstatistik Kurumu (2018). *27620 haber bülteni. (www.tuik.gov.tr/tuik-haber-bulteni.*
105. Ujita, S., Mizunuma, M., Matsuki, N. and Ikegaya, Y. (2011). *Asynchronously enhanced spiking activity of ischemic neuronal networks. Biol Pharm Bull, 34(5):764-7.*
106. Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J. ve ark. (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, 39:44-84.*

Kaynaklar Dizini Devamı

107. Vazquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. and Elsner, R. (2006) *Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 142:198-204.*

108. Vonshak, A., and Torzillo, G., (2003). *International workshop and training course on photobioreactors. Ebiltem Yayınları, 66.*

109. Volpe BT, Hirst W. (1983). *The characterization of an amnesic syndrome following hypoxic ischemic injury. Arch Neurol, 40:436-440.*

110. White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J. and Neumar, R.W. (2000). *Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. Journal of Neurological Sciences, 179:1-33.*

111. Wilhelm, J. (1990). *Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. Acta Universitatis Carolinae Medica Monographia, 137:1-53.*

112. Yağmurdur, H. ve Başar, H. (2007). *Ekstremitte Cerrahisinde Turnike Uygulamasına Bağlı İskemi-Reperfüzyon Hasar ve Anestezik Yaklaşım. TOTBİD Dergisi, 6(1-2).*

113. Yaidikar, L., Byna, B. and Thakur, S.R. (2014). *Neuroprotective Effect of Punicalagin against Cerebral Ischemia Reperfusion-induced Oxidative Brain Injury in Rats. J Stroke Cerebrovasc Dis, 23(10):2869-78.*

114. Yamamoto, M., Shima, T., Uozomi, T., Yamada, K. and Kawasaki, T. (1983). *A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of α -tocopherol administration. Stroke, 14:977-82.*

115. Yoshida, T., Limmroth, V., Irikura, K. and Moskowitz, M.A. (1994). *The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels. J Cereb Blood Flow Metab, 14:924-929.*

116. Yuan, J.P, and Chen, F. (2000). *Purification of trans-astaxanthin from a high- yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haeamatococcus pluvialis*. Food Chemistry, 68:443-448.*

117. Zhang, Y., Chen, Z., Girwin, M. and Wong, T. (2005). *Remifentanil mimics cardioprotective effects of ischemic preconditioning via protein kinase c activation in open chest of rats. Acta Pharmacology, 200:446-500.*

Kaynaklar Dizini Devamı

118. Zhang, X.S., Zhang, X., Zhou ML et al. (2014). *Amelioration of oxidative stres and protection against early brain injury by astaksantin after experimental subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg, 121:42-54.*

119. Zimmerman, B.J. and Granger, D.N. (1992). *Reperfusion injury. The Surgical clinics of North America, 72(1):65-83.*



Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı :Bengi YEGİN
Doğum tarihi ve yeri :11.01.1985/Beyoğlu
Uyruğu :T.C.
Medeni durumu :Bekar
İletişim adresleri :
Tel:05385153605
Email:bengiyegin@gmail.com

Eğitim Durumu

İlköğretim-Ortaöğretim	Çankaya İlköğretim Okulu	
Lise	Çankaya Anadolu Lisesi	
Lisans	Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi-Biyoloji Bölümü	2003-2007
Yüksek Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi-Anatomi	2010-2012
Doktora	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi-Anatomi	2013- 2018

Mesleki Deneyim : Araştırma Görevlisi 2012 -

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar: TÜYAB, FENS

Yayınlar :
(Makale, Sözlü Bildiri, Poster Bildiri, Kitap, Kitap Bölümü vd.)

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanmış yayınlar:

Can OD, Ulupinar E, Ozkay UD, **Yegin B**, Oztürk Y. The effect of simvastatin treatment on behavioral parameters, cognitive performance, and hippocampal morphology in rats fed a standard or a high-fat diet. Behav Pharmacol. 2012 sep;23(5-6):582-92)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler:
Sözlü bildiri:

Ulupinar E, Can OD, Demir Ozkay U, **Yegin B**. The effect of simvastatin on hippocampal morphology of rats exposed to high-fat diet during pre and postnatal period. 4. ISCAA (International Symposium Of Clinical And Applied Anatomy), Vol.6, O-05, S17, 28 Haziran – 1 Temmuz 2012, Ankara, TÜRKİYE

Poster Bildiri:

1. Ulupinar E, Can OD, Demir Ozkay U, **Yegin B**. The effect of simvastatin treatment on morris water maze performance of rats fed a standard or a high-fat diet. 8th Fens Forum of Neuroscience, 91.35, 2847, 14-18 Temmuz 2012, Barcelona, İSPANYA

2. Yegin B, Ulupinar E. The effects of perinatal high-fat diet exposure on the hippocampal functions and morphology. 4. ISCAA, Vol.6, P-65, S58, 28 Haziran – 1 Temmuz 2012, Ankara, TÜRKİYE

3. Yegin B, Ulupinar E. The effects of perinatal high-fat diet exposure on growth parameters and serum lipid profiles of the offspring. 4. ISCAA, Vol.6, P-166, S58, 28 Haziran – 1 Temmuz 2012, Ankara, TÜRKİYE

4.Yegin B, Alpay M, Kacar S, Ortadeveci A, Meral C.C, Kılıç C, Baskın V, Altuntaş H, Erol K. Effects of Agmatine on stress induced on hippocampal morphology in rats. The anatomists on the edge conferance. 27-29 Haziran 2017, Galway-İRLANDA

5.Yegin B, Alpay M, Burukoğlu Donmez D, Oz S, Yucel F, Ozden F. Dose dependent effect of Astaxanthin against ischemia/reperfusion injury on morphology of kidney. The anatomists on the edge conferance. 27-29 Haziran 2017, Galway-İRLANDA

6.Alpay M, **Yegin B**, Meral C.C, Kaçar S, Ortadeveci A , Kılıç C, Baskın V, Altuntaş H, Erol K. Investigation of dose-dependent effects of Agmatine on rat kidney. The anatomists on the edge conferance. 27-29 Haziran 2017, Galway-İRLANDA

7.Alpay M, **Yeğın B**, Meral C.C, Ortadeveci A, Kaçar S, , Kılıç C, Baskın V, Altuntaş H, Erol K. Effects of Agmatine on the histologic alterations of rat

cerebellum. The anatomists on the edge conferance. 27-29 Haziran 2017, Galway-İRLANDA

8.Meral Eviş C.C, Kaçar S, Ortadeveci A, **Yegin B**, Alpay M, Kılıç C.S, Altuntaş H, Baskın V, Erol K. Effects Of Agmatine On Stress-Induced Gastric Ulcer In Rats. IUPS 38th World Congress, Rhythms of Life. 1-5 Ağustos 2017, Rio de Janeiro, BREZİLYA.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Bengi YEGIN. Socrates, Eskişehir Türk Dünyası Uygulama ve Araştırma Merkezi Klinik Anatomi Dergisi, Cilt 1, Sayı 1, 2016.
2. Hilal GOREN, Bengi YEGIN. Aşk Oyunları, Türk Dünyası Uygulama ve Araştırma Merkezi Mizah ve Oyun Kültürü Dergisi, Cilt 1, Sayı 1, 2016.
3. Bengi YEGIN, Meltem ALPAY. Bağımlılık Yapan Maddeler, Türk Dünyası Uygulama ve Araştırma Merkezi Gençlik Dergisi, Cilt 1, Sayı 1, 2016.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. Canbaz Kabay S, Oz S, Ozden H, Burukoglu D, Kus G, **Yegin B**, Ustuner C, Senturk H, Misirlioglu M, Fatma Yildiz F, Aydemir D. Unilateral a. carotis communis'in iskemi reperfüzyon modelinde Lumbricus extractının antioksidan sistem ve beyin üzerindeki koruyucu etkisinin araştırılması.15. Ulusal Anatomi Kongresi, 11-14 Eylül 2014, Malatya, TÜRKİYE.
- 2.Gören H, **Yegin B**, Alpay M. Anatomi Anabilim dalımızda beden bağışi durum analizi ve örnek uygulamalar, 17. Ulusal Anatomi Kongresi, An international journal of experimental and clinical anatomy; volume 10; 159-160. 5-9 Eylül 2016, Ekişehir, TÜRKİYE.

Bilimsel Etkinlikler

Projeler :

1. Erken gelişim dönemlerinden itibaren yüksek yağ içerikli diyetle beslenen yavrularda hippocampus morfolojisinin stereolojik yöntemlerle incelenmesi ve davranış parametreleriyle karşılaştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, 201211D02, 01.02.2012, Yrd. Araştırmacı, 2012.
2. İskemi-reperfüzyon uygulanan sıçan beyinde ciproxifan maddesinin doza bağlı etkileri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, 201711019, Yrd. Araştırmacı, 2017-devam ediyor

Sözlü Konferans veya Seminerler :
Kurslar ve Eğitim Programları :

1. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 20 Eylül - 1 Ekim 2010, Eskişehir
2. Deneysel ve Klinik Çalışmalarda Nörostereoloji Kursu, 8 Nisan 2011, İstanbul
3. 6. Beyin Bilgi Yarışması, 26 Şubat 2013, ESKİŞEHİR
4. Kadavradan Molekule Temel Nöro-anatomi: Multimediyatik Nöromorfoloji Turu Kursu, 28 Nisan 2013, İZMİR
5. Radyolojik Görüntülerin Stereolojik İşlenmesi Kursu, 05 - 08 Eylül 2013, SAMSUN
6. Baygen Laboratuar ve Sağlık Hizmetleri, Makroskopi kabin eğitimi, 7 Mart 2013, Eskişehir
7. 5th International Scientific Writing Workshop, 28-30 Nisan 2015, SAMSUN
8. 10. Beyin Bilgi Yarışması, 7 Mart 2017, ESKİŞEHİR
9. 10. Nöropsikiyatri Günler'inde gerçekleştirilecek olan Nöroanatomi kursu (26-27 Ekim)(İstanbul)
10. Eğiticinin Eğitimi Sertifika Programı (1-30 Kasım 2017) (Sakarya Üniversitesi)

