

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

KAS FLEPLERİ İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA  
QUERCETİN'İN ETKİLERİ : DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr. Metin ARICI

Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi  
Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2006

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

KAS FLEPLERİ İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA  
QUERCETİN'İN ETKİLERİ : DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr. Metin ARICI

Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi  
Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI  
Doç. Dr. CENGİZ ÇETİN

ESKİŞEHİR

2006

## TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Metin ARICI'ya ait "Kas Flepleri İskemi Reperfüzyon Hasarında Quercetin'in Etkileri : Deneysel Çalışma" adlı çalışma jürimiz tarafından Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:21/8/2006

Jüri Başkanı	Doç.Dr.Cengiz ÇETİN Plastik Rek. Ve Estetik Cer. A.D	İmza
Üye	Doç.Dr.A.Aydan KÖSE Plastik Rek. Ve Estetik Cer. A.D	İmza
Üye	Yrd.Doç.Dr.Yakup KARABAĞLI Plastik Rek. Ve Estetik Cer. A.D	imza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun  
...../...../2006 Tarih ve ../. Sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Erol GÖKTÜRK

Dekan

## TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimlerini aktararak yol gösteren sayın hocalarım Doç. Dr.Cengiz ÇETİN, Doç.Dr. A.Aydan KÖSE ve Yrd.Doç.Dr. Yakup KARABAĞLI'ya; birlikte çalışmaktan keyif duyduğum asistan arkadaşlarım Dr.A. Emre KOÇMAN, Dr.İdris ELMAS, Dr.A. Ceyla ÖZBAYOĞLU ve Dr.Tamer ŞAKRAK'a; tez çalışmaları sırasında yardım eden Biyokimya, Histoloji ve Embriyoloji, Biyoistatistik Anabilim Dalı çalışanlarına; dostluk ve desteklerini gördüğüm poliklinik, klinik ve ameliyathane hemşire ve personellerine; özveri ve sabırlarından dolayı sevgili eşim Nurdane ve oğlum Yiğit'e; beni cesaretlendiren anne ve babama sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

## ÖZET

**ARICI, M.: Kas Flepleri İskemi Reperfüzyon Hasarında Quercetin'in Etkileri: Deneysel Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2006.** Çalışmanın amacı, antioksidan özelliğe sahip bir flavonoid olan Quercetin kullanarak, deneysel olarak serbest kas dokusu aktarımını ifade eden bir modelde, iskemi reperfüzyon hasarını incelemektir. Çalışmada 21 rat, 3 eşit gruba ayrıldı. 1. grup (n= 7) noniskemik kontrol grubu (K), 2. grup (n= 7) iskemi reperfüzyon grubu (İ/R), 3. grup (n= 7) iskemiden 1 saat önce intraperitoneal 50 mg/kg Quercetin verilen iskemi reperfüzyon + Quercetin (İ/R+Q) grubuydu. Deney, tüm gruplarda latissimus dorsi kas fleplerini kaldırdıktan sonra, 2 ve 3. grup ratlarda latissimus dorsi kas fleplerini 4 saat normotermik no flow iskemi, 2 saat reperfüzyona maruz bırakarak yapıldı. Biyokimyasal analiz olarak bütün gruplarda doku içeriğindeki süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü. Histolojik olarak bütün gruplarda doku içine infiltre olan lökosit ve mast hücreleri sayıldı. SOD düzeyleri İ/R grubunda, K ve İ/R+Q grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu (P<0.01). MDA düzeyleri İ/R grubunda, K ve İ/R+Q grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (P<0.001). Doku nötrofil sayıları İ/R grubunda, K ve İ/R+Q grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulundu (P<0.01). Doku mast hücrelerinin aktivasyonu Quercetin ile engellendiği için granüle ve degranüle şekilleri ayrı ayrı sayıldı. Degranüle olan mast hücrelerinde İ/R grubu ile K ve İ/R+Q grupları arasında İ/R grubu lehine önemli düzeyde fark bulundu (P<0.01). İ/R grubunun granüle ve degranüle mast hücreleri arasında degranülasyon lehine önemli düzeyde fark bulundu (P<0.05). Degranüle mast hücresi ile nötrofil hücresi arasında anlamlı şekilde ilişki bulundu (P<0.001). Bu sonuçlar iskemi reperfüzyona maruz kalmanın dokularda ciddi hasar oluşturduğunu, Quercetin verilmesiyle dokuların oksidatif ve yangısal hasardan korunduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kas flebi, İskemi-Reperfüzyon, Quercetin, Mast Hücresi

## SUMMARY

**ARICI, M.: The Effects Of Quercetin In Ischemia Reperfusion Injury Of Muscle Flaps : Experimental Study, Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery, Eskişehir, 2006.** The aim of the study is to examine the injury of ischemia reperfusion by using Quercetin, which has a feature of being antioxidant, in a model of serving free muscle tissue as an experiment. In the study 21 rat were divided into 3 equal groups. 1.group (n=7) is nonischemic control group (K), 2.group (n=7) is ischemia reperfusion group (I/R), 3.group (n=7) is ischemia reperfusion + Quercetin (I/R+Q) group which was given intraperitoneal 50 mg/kg Quercetin on hour before the ischemia. The experiment was done in all group safter the muscle flaps were roused by latissimus dorsi, in 2. and 3.group rats latissimus dorsi muscle flaps were suffered by normotermik no flow ischemia for 4 hours and by reperfusion for 2 hours. As a biochemistry analysis in all groups the rates of superoxide dismutase (SOD) in the content of tissue and malondialdehyde (MDA) were measured. Histologically leukocyte and mast cells, whicw are infiltrated in tissue in all groups were counted. SOD rates in I/R group were found meaningfully lower when compared with K and I/R+Q groups ( $P < 0,01$ ). MDA rates in I/R group were found meaningfully higher when compared with K and I/R+Q groups ( $P < 0,001$ ). Tissue neutrophil numbers in I/R group were found meaningfully higher when compared with K and I/R+Q groups ( $P < 0,01$ ). As the activation of tissue mast cells was blocked with Quercetin, granulation and degranulation shapes were counted one by one. In mast cells, having degranulated; an important difference was found to the favor of I/R group ( $P < 0,01$ ). Between the granulation and degranulation mast cells of I/R group, an important difference was found to the favor of degranulation ( $P < 0,05$ ). A meaningful relation, between the degranule mast cell and neutrophil cell, was found ( $P < 0,001$ ). These outcomes show that suffering ischemia referfusion damages the tissues seriously, however giving Quercetin saves the tissues from oxidative and inflammatory damages.

Key words: Muscle flap, Ischemia reperfusion, Quercetin, Mast cell

## İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	v
SUMMARY .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	lix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	i
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1.Kas Flepleri ve Latissimus Dorsi Kas Flebi .....	3
2.2.İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi .....	5
2.2.1.İskemi .....	5
2.2.2.Reperfüzyon .....	8
2.2.3.Nötrofillerin Rolü .....	9
2.2.4.Mast Hücrelerinin Rolü.....	10
2.3.Serbest Radikaller.....	12
2.3.1.Serbest Radikalin Tanımı .....	12
2.3.2.Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Ürünleri .....	12
2.3.2.1.Süperoksit Radikali.....	13
2.3.2.2.Perhidroksi Radikali.....	14
2.3.2.3.Hidrojen Peroksit .....	14
2.3.2.4.Hidroksil Radikali.....	14
2.3.2.5.Singlet Oksijen .....	15
2.3.2.6.Nitrik Oksit (NO) .....	16
2.3.2.7.Peroksil Radikali.....	16
2.4.Hücrel Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları .....	16
2.4.1.Serbest Radikallerin Kaynakları.....	16
2.4.2.Mitokondriyal Solunum Zinciri .....	17
2.4.3.Araşidonik Asit Kaskadı .....	17
2.4.4.Ksantin Oksidaz (XO) .....	17
2.5.Hücre Dışı Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları .....	18
2.5.1.Katekolaminler .....	18
2.5.2.Polimorfonükleer Lökositler (PNL) .....	19
2.6.Serbest Radikallerin Etkileri .....	19
2.6.1.Hücre İçi Etkileri.....	19
2.6.1.1.Membran Lipidleri Üzerine Etkileri.....	19
2.6.1.2.Proteinler Üzerine Etkileri.....	21
2.6.1.3.Nükleik Asitler Üzerine Etkileri.....	21
2.6.1.4.Karbonhidratlar Üzerine Etkileri.....	22
2.6.2.Hücre Dışı Etkiler.....	22
2.6.2.1.Kemotaksi .....	22
2.6.2.2.Rolling .....	22
2.6.2.3.Adhezyon .....	22
2.6.2.4.Antiadhezyon Molekülleri İnhibisyonu .....	23

2.7. Antioksidan Savunma Sistemi.....	23
2.7.1. Enzimatik Antioksidan Savunma.....	24
2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	24
2.7.1.2. Katalaz.....	25
2.7.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px).....	25
2.7.1.4. Glutatyon S Transferaz.....	25
2.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri.....	26
2.7.2.1. Glutatyon (GSH).....	26
2.7.2.2. Askorbik Asit (C Vitamini).....	26
2.7.2.3. E Vitamini.....	26
2.7.2.4. Karotenoidler.....	26
2.7.2.5. Melatonin.....	27
2.8. Flavonoidler.....	27
2.8.1. Yapıları ve Genel Özellikleri.....	27
2.8.2. Quercetin.....	27
2.8.2.1. Genel Özellikleri.....	27
2.8.2.2. Antioksidan Özellikleri.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	31
3.1. Deney Protokolü.....	31
3.2. İstatistiksel Verilerin Analizi.....	32
3.3. Histolojik Yöntem.....	35
3.4. Biyokimyasal Yöntem.....	35
3.4.1. Doku Malondialdehid Düzeyinin Ölçümü.....	35
3.4.2. Doku Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	35
4. BULGULAR.....	37
4.1. Histolojik İnceleme.....	37
4.2. Biyokimyasal Sonuçlar.....	42
4.2.1. MDA Sonuçları.....	42
4.2.2. SOD Düzeyleri.....	42
4.3. İstatistik Sonuçları.....	43
4.3.1. MDA Düzeyleri.....	43
4.3.2. SOD Düzeyleri.....	44
4.3.3. Nötrofil Hücreleri.....	45
4.3.4. Mast Hücreleri.....	46
4.3.5. Mast / Nötrofil Hücre Sayılarının Karşılaştırılması.....	49
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ.....	57
7. KAYNAKLAR.....	58



## SİMGELER VE KISALTMALAR

SOD : Süperoksit Dismutaz  
 EC-SOD : Ekstrasellüler Süperoksit Dismutaz  
 MDA : Malondialdehit  
 İ/R : İskemi / Reperfüzyon  
 İ/R+Q : İskemi / Reperfüzyon +Quersetin  
 ATP : Adenozin Trifosfat  
 ADP : Adenozin Difosfat  
 NAD : Nikotinamid Dinükleotid  
 $Ca^{2+}$  : Kalsiyum  
 $Na^{+}$  : Sodyum  
 $H^{+}$  : Hidrojen  
 $K^{+}$  : Potasyum  
 PLC : Fosfolipaz C  
 $PIP_2$  : Fosfotidil İnozitol Bifosfat  
 DAG : Diaçilgliserol  
 $IP_3$  : İnozitol Trifosfat  
 PNL : Polimorfonükleer Lökositler  
 XO : Ksantin Oksidaz  
 C5a : Kompleman 5a  
 C3a : Kompleman 3a  
 LB4 : Lökotrien B4  
 NO : Nitrik Oksit  
 PAF : Trombosit Aktive Edici Faktör  
 TNF- $\alpha$  : Tümör Nekroz Faktörü- $\alpha$   
 LAM-1 : Lökosit Adezyon Molekülü-1  
 ICAM-1 : İntersellüler Adezyon Molekülü-1  
 ELAM-1 : Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü-1  
 $O_2^{\bullet -}$  : Süperoksit Anyon Radikali  
 $H_2O_2$  : Hidrojen Peroksit  
 $OH^{\bullet}$  : Hidroksil Radikali  
 HOCl : Hipoklorik Asid  
 MMC : Mukozal Mast Hücreleri  
 SMC : Serozal Mast Hücreleri  
 CTMC : Bağdoku ( connective tissue) Mast Hücreleri  
 $HO_2^{\bullet}$  : Perhidroksi Radikali  
 $ROO^{\bullet}$  : Peroksil Radikali  
 $^1O_2$  : Singlet Oksijen  
 $ONOO^-$  : Peroksinitrit  
 DNA : Deoksiribonükleik Asid  
 PGG : Prostaglandin G  
 PGH : Prostaglandin H  
 ROOH : Organik Hidroperoksi  
 GSH : Glutasyon

## ŞEKİLLER

	Sayfa
<b>Şekil 2.1</b> : Kas fleplerinin kanlanma şekillerine göre Mathes-Nahai sınıflaması.....	4
<b>Şekil 2.2</b> : Hücre membranı normal iyon dengesi.....	6
<b>Şekil 2.8</b> : Quercetin'in yapısı ve antioksidan özellik gösteren grupları.....	29
<b>Şekil 3.1</b> : Latissimus Dorsi Kası.....	33
<b>Şekil 3.2</b> : Latissimus dorsi kası kısmen kaldırılmış, torakodorsal arter pedikülü izleniyor.....	33
<b>Şekil 3.3</b> : Latissimus dorsi kasının pedikül üzerinden tamamen kaldırıldıktan sonraki görünümü.....	34
<b>Şekil 3.4</b> : Latissimus dorsi kası pedikül üzerinden tamamen kaldırıldıktan sonra mikrovasküler klemp ile pedikülün total oklüzyonu.....	34
<b>Şekil 4.1</b> : K grubuna ait kesitte grup halinde kas lifleri.H&E.....	37
<b>Şekil 4.2</b> : İ/R grubuna ait kesitte kas lifleri arasında (→)nötrofil infiltrasyonu(PNL) yaygın olarak gözleniyor.....	38
<b>Şekil 4.3</b> : İ/R grubuna ait kesitte bazı kas liflerinde(→)iç organizasyon bozulmuş olarak gözleniyor.H&E.....	38
<b>Şekil 4.4</b> : İ/R+Q grubuna ait kesitte gruplar halinde enine çizgilenme gösteren kas lifleri. H&E.....	39
<b>Şekil 4.5</b> : K grubuna ait kesitte (→) granüle mast hücreleri. Toluidine mavisi.....	40
<b>Şekil 4.6</b> : İ/R grubuna ait kesitte (→) degranüle mast hücreleri . Toluidine mavisi.....	40
<b>Şekil 4.7</b> : İ/R + Q grubuna ait kesitte çoğunluğu(→)granüle mast hücreleri.Toluidine mavisi.....	41
<b>Şekil 4.8</b> : İ/R + Q grubuna ait kesitte (→)granüle mast hücreleri büyük büyütme ile gözleniyor. Toluidine mavisi.....	41
<b>Şekil 4.9</b> : Doku MDA düzeyleri (K: Kontrol, İ/R: İskemi Reperfüzyon, İ/R+Q: İskemi Reperfüzyon+Quercetin).....	43

<b>Şekil 4.10</b> : Doku SOD düzeyleri (K: Kontrol, İ/R: İskemi Reperfüzyon, İ/R+Q: İskemi /Reperfüzyon+Quercetin).....	44
<b>Şekil 4.11</b> : Doku nötrofil sayıları (K: Kontrol, İ/R: İskemi Reperfüzyon, İ/R+Q: İskemi /Reperfüzyon+Quercetin).....	46
<b>Şekil 4.12</b> : Doku mast hücreleri granüle/degranüle karşılaştırılması (K: Kontrol, İ/R: İskemi /Reperfüzyon, İ/R+Q : İskemi /Reperfüzyon+Quercetin).....	48
<b>Şekil 4.13</b> : Degranüle olmuş mast hücre sayısı ile nötrofil sayısı arasındaki ilişki.....	49

**TABLULAR**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.1</b> : Reaktif oksijen ürünleri ve kimyasal gösterimleri.....	13
<b>Tablo 2.2</b> : Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.....	24
<b>Tablo 4.1</b> : Doku MDA Düzeyleri.....	42
<b>Tablo 4.2</b> : Doku SOD Aktivitesi Düzeyleri.....	42
<b>Tablo 4.3</b> : Doku Nötrofil Sayıları.....	45
<b>Tablo 4.4</b> : Nötrofil Hücre Karşılaştırılması.....	45
<b>Tablo 4.5</b> : Doku Mast Hücre Sayısı.....	46
<b>Tablo 4.6</b> : Mast Hücresi Granüle / Degranüle Karşılaştırılması.....	47
<b>Tablo 4.7</b> : Mast Hücresi Granüle / Degranüle Oranlaması.....	48

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

İskelet kası İ/R hasarının fizyopatolojisi karmaşıktır ve pek çok faktör bu olayda etkilidir (1-3). Bu olay, kompleks doğası nedeni ile mikrovasküler flep ve replantasyon cerrahisi için ciddi problem olmaya devam etmektedir. Problemin çözülmesine yönelik yaklaşımlardan biri farmakolojik ajanlar ile fleplerin iskemiye toleranslarının artırılması ve iskeminin olumsuz etkilerinin azaltılmasıdır (4).

İ/R hasarından sorumlu tutulan faktörler serbest oksijen radikallerinin toksik etkileri (1), nötrofil (2) ve mast hücrelerinin (3) yangısal etkileridir.

Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri üzerine birçok çalışmalar yapılmıştır. Serbest radikallerin düşük düzeyleri; steroidler, eikazonoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin defoksifikasyonu, immünitede mikroorganizmalara karşı savunma gibi birçok biyokimyasal süreçte gereklidir. Serbest radikallerin yüksek düzeyleri ise hücresel bozukluklara yol açabilen oksidatif stresle sonuçlanır. Reperfüzyondan sonra serbest radikallerin ortamda fazlaca artması ya da antioksidan sistemin yetersiz kalması sonucu hücre membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler etkilenerek doku hasarı ortaya çıkmaktadır (5).

Reperfüzyon hasarının önemli bir nedeni de, iskemik bölgeye lökositlerin, öncelikle nötrofillerin infiltrasyonudur. Aktive olmuş nötrofiller, antimikrobiyal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyonda gelen moleküler oksijenden seri reaksiyonlar sonucunda toksik radikaller oluşturarak, ileri doku hasarına neden olurlar (5). Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akışının geri dönmemesi fenomenine (*no reflow*), aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçları oluşturduğu bildirilmiştir (6).

Mast hücreleri, bağ dokularında yerleşim gösteren granüllü hücrelerdir. Çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda; mast hücrelerinin granüllerinin içeriğini hücre dışına boşalttıkları bilinmektedir. Bu hücreler; İ/R hasarı, endotoksinler, çinko zehirlenmeleri, kolinerjik stimülasyon, hipertermi,

inflamasyon ve hipersensitivite reaksiyonlarında degranüle olarak fonksiyon yaparlar (3,7). Mast hücrelerinin en önemli fonksiyonlarından biri de diğer bağışıklık sistem hücrelerini inflamasyon ve enfeksiyon alanına toplamasıdır. Böylece karşılıklı etkileşimle doku hasarının şiddetini artırırlar.

Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin hücre membranlardaki doymamış yağ asitlerine saldırısı sonucu başlar ve bazı aldehit ürünleri oluşur. Bu ürünlerden birisi olan malondialdehit (MDA) lipid hasarının sık kullanılan bir göstergesidir (5).

Antioksidanlar serbest radikalleri ortadan kaldırarak İ/R hasarını azaltırlar. Endojen antioksidanlardan biri olan süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit anyon radikalini yakalayarak hidrojen peroksite dönüştürür (5).

Flavonoidler özellikle Quercetin, meyve sebzelerin rengini veren güçlü antioksidanlardır. Aynı zamanda lökosit adhezyonu ve aktivasyonunu azalttığı ve mast hücre degranülasyonunu önlediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (8-15).

Bu çalışmanın amacı, rekonstrüktif cerrahide sık kullanılan kas fleplerinin ratlarda Quercetin verilerek farmakolojik müdahale ile İ/R hasarına karşı yaşayabilirliğini üzerine etkisini araştırmaktır. Bu amaçla serbest kas dokusu aktarım modelinde Quercetin'in koruyucu etkisini araştırmak için doku SOD ve MDA düzeyleri çalışıldı. Dokuya infiltre olan nötrofil ve mast hücreleri sayıldı ve mast hücre degranülasyonunun inhibisyonu histolojik olarak araştırıldı.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.Kas Flepleri ve Latissimus Dorsi Kas Flebi

Form ve fonksiyon oluşturmak amacı ile kanlanması orijinal yerinden ayrılmadan ya da aktarıldığı yerde devam edecek şekilde başka bir vücut bölgesine aktarılan doku parçasına flep denir (16).

Flep tiplerinden biri olan kas ve kas-deri flepleri, plastik rekonstrüktif ve estetik cerrahi pratiğinde sık kullanılan ve hacimsel doku kayıplarını kapamada üstün olan fleplerdir. Bu fleplerin birçok avantajı vardır. Üzerlerinde taşınabilir geniş boyutta deri sağlarlar; enfeksiyona daha dirençlidirler; flebin güvenli olarak kaldırılmasını ve tahmin edilebilir bir rotasyon arkını sağlayan sabit vasküler anatomileri vardır (16).

Kas flepleri kanlanma şekillerine göre 5 tip olarak sınıflandırılır (17).

Tip 1) Tek bir major vasküler pedikülü vardır.

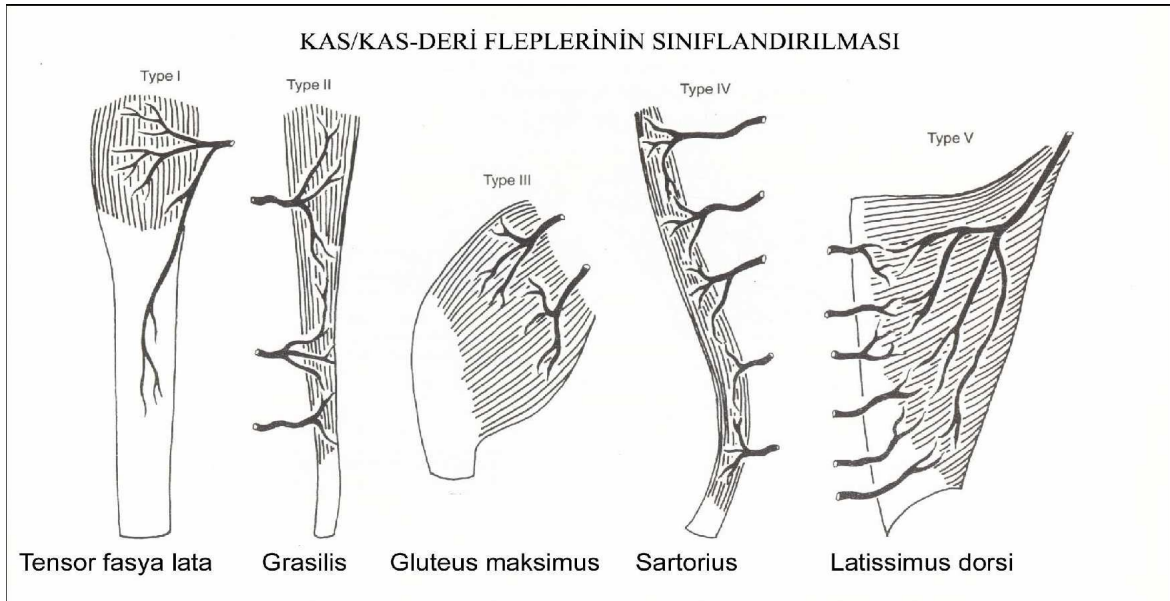
Tip 2) Dominant vasküler pedikül ve minör vasküler pedikülleri vardır. Ancak minör pediküller tek başına kasın tamamının yaşamasını sağlayamaz. İnsanlarda en sık görülen dolaşım tipi budur.

Tip 3) İki adet büyük vasküler pedikül vardır. Her ikisinde ayrı ayrı tüm kası besleyebilecek potansiyele sahiptir.

Tip 4) Genellikle eşit büyüklükte birkaç vasküler pedikül vardır ve her segmental pedikül kasın bir kısmını besler. Bu nedenle rotasyon arkları kısıtlıdır.

Tip 5) Bu kasların bir tane dominant arteri vardır ve tek başına kası yaşatabilir. Ayrıca kasa zıt taraftan giren sekonder vasküler pediküller vardır ki bunlarda kası yaşatabilecek potansiyele sahiptir.

Latissimus dorsi kası bu sınıflamada tip 5 içine girer (Şekil 2.1). Dominant pedikülü, torakodorsal arter ve komitant venler oluşturur. Sekonder pediküller ise lateralde, posteriyor interkostal arter ve venlerin dalları; medialde, lumber arter ve venlerin dalları tarafından oluşturulur.



**Şekil 2.1** : Kas fleplerinin kanlanma şekillerine göre Mathes-Nahai sınıflaması. Çağdaş, A ve ark. (16)'ndan alınmıştır.

Latissimus dorsi kası çok geniş, üçgen şeklinde bir kastır. *Fascia thoracolumbalis* aracılığı ile alt 6 torakal vertebra spinaları, bütün lomber ve sakral vertebra spinaları, krista iliyaka dış kenarı, son 4 kosta dış yüzleri ve skapula alt açısından başlayarak, yassı bir tendon halinde humerus proksimalindeki sulkus intertuberkularis'in tabanına yapışır. Siniri C7-C8'den gelen *nervus thoracodorsalis*'tir. Kasın fonksiyonu kola ekstansiyon, adduksiyon ve iç rotasyon yaptırmaktır (18).

Kas flepleri eğer dominant pedikül üzerinden kaldırılırsa "standart flep", sekonder pediküller üzerinden kaldırılırsa "reverse flep" olarak adlandırılır. Kas flepleri tek başlarına, üzerinde cilt adası ile birlikte, motor veya sensoriyel sinirle ve komşu kemikle birlikte kullanılabilir (15).

Ratlardaki latissimus dorsi flepleri insandaki eşdeğeri ile büyük anatomik benzerliğe sahiptir. Ancak aksiller arterin ratlarda brakial arter olmadan önceki son dalı sirkumfleks-subskapuler trunkustur. Trunkusun en kalın dalı subskapuler arterdir. Bu arterden sirkumfleks skapuler ve torakodorsal arterler ayrılır. Torakodorsal arter ikiye ayrılarak bir dalı latissimus dorsi diğer dalı serratus anterior kaslarının baskın dolaşımını



sağlar. İnsanda artere proksimalde iki ven eşlik ederken ratlarda tek ven vardır. Ratlarda latissimus dorsi serbest kas flebi 1400 mg ağırlığında ve 35x25mm boyutlarda olup pedikül uzunluğu 19 mm'dir (19).

## 2.2.İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

### 2.2.1.İskemi

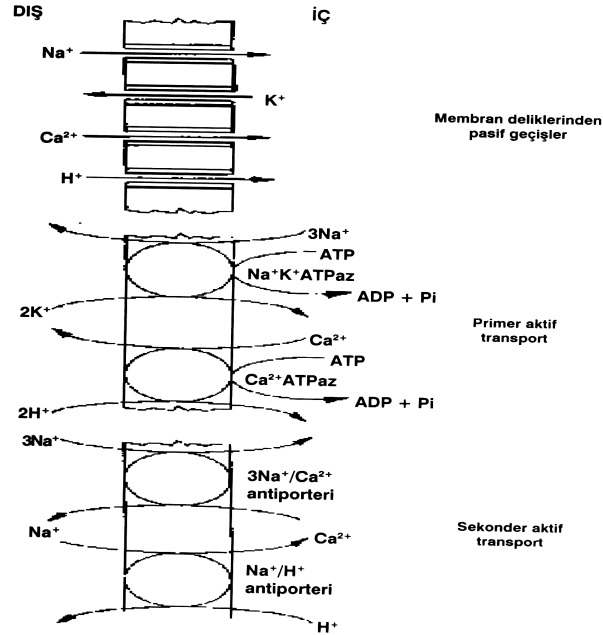
Akut iskemilerde doku hasarının temel nedeni, oksijen ve enerji kaynaklarının tüketilmesi ve anaerobik metabolizmanın egemen olmasıdır. Fizyolojik olarak kasın enerji kaynağı olan kimyasal ürünler adenozin trifosfat (ATP) ve kreatinin fosfokinaz (CPK)'dır. İskemiden sonra ATP depoları inorganik fosfat ve kreatinin ATP ye çevrilmesi ile 3 saate kadar başlangıç düzeyinde tutulabilir (20). Ancak iskemi devam ettiği takdirde enerji eksikliğine bağlı olarak aşağıdaki olaylar oluşur:

**1- Asidoz:** Doku hipoksi veya anoksisi, *crebs* döngüsüyle aerobik oksidasyonda azalmaya ve hücrede bulunan ATP miktarında düşüşe neden olur. Bu durum adenozin difosfat (ADP) ile fosfat birikimine ve *Embden-Meyerhoff* yolundaki anaerobik glikolizde artmaya neden olur. Sonuçta laktik asit ve pürivik asit oluşur. Laktat artışı ve  $H^+$  birikimi ile doku pH'sında düşmeye neden olur. Laktik asit ve düşük pH, protein denetürasyonu, enzim fonksiyonlarında kayıp, NADH rejenerasyonunun engellenmesi ve serbest radikal oluşumu gibi iskemik hasar oluşturan etkenlerin gelişimini artırır (21).

**2- Makromolekül sentezinin durması:** ATP seviyesindeki azalma ile birlikte fosfolipid, protein, polisakkarid ve nükleik asitlerin spontan veya enzim kaynaklı parçalanmalarının ardından bu yapı taşlarının yeniden sentezlenememesi nedeniyle hücre bütünlüğü bozulmaya başlar. Aynı zamanda hücre içi  $Ca^{2+}$  artışının neden olduğu fosforilaz, lipaz, proteaz ve endonükleaz enzim aktivasyonları da bu parçalanmaya katkıda bulunur (21).

**3- İyon dengesinin bozulması:** İskeminin ciddiyetine ve süresine göre hücre membranının fizyolojik bütünlüğü bozulmaya başlar. İskeminin ilk etkilediği yer mitokondridir. ATP miktarındaki net azalma  $Na^+/K^+$  ATPaz enzimini inhibe eder. Buna bağlı olarak hücre içi  $Na^+$  ve su artışı ile hücrede şişme meydana gelir. Hücre dışı  $K^+$  artar.  $Na^+$  artışı ile  $Na^+/Ca^{2+}$  ve  $Na^+/H^+$

değişim sistemleri aktive olur. Sonuçta hücre içine  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{H}^+$  akışı başlar. Hücre içi  $\text{Na}^+$  artışı membranda depolarizasyon yaparak, geçici açılan voltaj bağımlı  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının açılmasına ve hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  miktarının artmasına neden olur. Hücre içinde  $\text{Ca}^{2+}$  artması sonucunda fosfolipaz aktivitesi artarak fosfolipidlerin parçalanmasına neden olur. Araşidonik asit ortaya çıkarak serbest radikal oluşturan siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolları aktive olur (5). Stoplazmada artan serbest  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ 'a bağımlı ATP'az enzimini aktive ederek hücre içi ATP daha hızlı tüketilir (21,22). Yüksek  $\text{Ca}^{2+}$  seviyeleri mitokondri iç zara etki ederek oksidatif fosforilasyonu ve ATP yapımını azaltır (22). Ayrıca yüksek  $\text{Ca}^{2+}$  seviyeleri serbest radikal oluşumunu artırır (23). Yüksek  $\text{Ca}^{2+}$  seviyelerinin, proteaz aktivasyonunu sonucu ksantin oksidaz enziminin iskemik dokuda ortaya çıkmasında, nötral proteazlar ve lizozomal proteazların aktivasyonu ile hücre iskeleti protein yapıların yıkılması sonucu geri dönüşsüz hasarda rol oynadıkları ortaya konmuştur (21). Hücre membranı normal iyon dengesi şekil 2.2' de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2** : Hücre membranı normal iyon dengesi. İşlekel, H ve ark.(21)'dan alınmıştır.

İ/R hasarının gelişmesinde son derece önemli olan hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  artışı başlıca üç yolla olmaktadır:

**a - Hücre dışından  $Ca^{2+}$  girişi:** ATP'in tükenmesi ile birlikte aktif  $Na^+$  transport pompaları ( $Na^+/K^+$  ATPaz,  $Na^+/Ca^{2+}$  ve  $Na^+/H^+$  değişim sistemleri) bozulmaktadır (21).

**b- Hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarından  $Ca^{2+}$  serbestlenmesi:** Hücrelerde belli uyarılarla hücre içi depolardan hücre membranı reseptörü aracılığı ile  $Ca^{2+}$  serbestlenmesi gerçekleşmektedir. Agonistin G proteini aracılığı ve fosfalipaz C (PLC) ile eşlenmiş olarak bulunan reseptöre bağlanması, fosfotidil inozitol bifosfat ( $PIP_2$ )'in diaçilgliserol (DAG) ve inozitol trifosfat ( $IP_3$ )'a ayrılmasına neden olmaktadır.  $IP_3$ , endoplazmik retikulumdan  $Ca^{2+}$  salınımını gerçekleştirmektedir (21).

**c- İntrasellüler  $Ca^{2+}$  düzeyini kontrol eden mekanizmaların bozulması:** Hücre içine giren veya intrasellüler olarak salgılanan  $Ca^{2+}$  iki şekilde tamponlanmaktadır. Bunlardan birincisi kalmodilin gibi efektör bir proteine veya kalsibindin gibi özel bağlayıcı proteine bağlanarak gerçekleşmektedir.  $Ca^{2+}$  negatif gruplara bağlanarak tamponlanması, hidrojen iyonunun tamponlanması ile benzerlik gösterdiğinden,  $Ca^{2+}$  ve  $H^+$  aynı tampon bölgeleri için yarışa girerler. Bu nedenle, iskemi sonucu gelişen asidozda  $Ca^{2+}$ , bu bağlanma bölgelerinden salınmaktadır. Hücre içi  $Ca^{2+}$ 'un bir diğer tamponlanma şekli de hücre içi organeller tarafından tutulma yoluyla'dır. Kalsiyumun endoplazmik retikulum, mitokondri gibi organellerce tutulması enerji gerektiren bir olaydır. Normal koşullarda, mitokondrinin tutuluma katkısı çok azdır (4). Hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu hızla artınca mitokondri büyük miktarlarda  $Ca^{2+}$  u tutar. Bunun için mitokondri iç membranının elektriksel potansiyeli gerekmektedir. Bu potansiyel de sadece  $O_2$  ve ATP varlığında oluşturulabilmektedir. Mitokondrinin çok miktarlarda  $Ca^{2+}$  tutması mitokondrial hasarı oluşturan en önemli nedenler arasındadır (21). İntrasellüler  $Ca^{2+}$  artışını tamponlayan mekanizmalar arasında bulunan mitokondride kalsiyum tutuluşu iskemi sırasında mitokondrinin  $Ca^{2+}$  ile aşırı yüklenmesine neden olmaktadır. İskeminin ilk dakikalarında oksijen konsantrasyonu düşüklüğüne bağlı olarak durma noktasına gelen hücrenin solunum fonksiyonları ve ATP sentezi, mitokondrideki bu  $Ca^{2+}$  birikimi ile daha da bozulmaktadır. Böylece hücrede ATP eksikliği ile başlayan iskemik

sürecin gelişiminde, hücre içi  $Ca^{2+}$  artışının bir sonucu olarak ATP sentezi giderek azalmakta ve olaylar kısır bir döngü içine girmektedir (21).

**4- ATP yıkım ürünlerinin birikimi:** İskemide enerji eksikliği sonucu gelişen olayların bir diğer sonucu da ATP yıkım ürünlerinin birikmesidir. İskemi sırasında ATP oluşumunun bozulmasına karşın, mevcut ATP'nin hidrolizi sürmektedir. ATP hidrolizi ile hipoksantin, ksantin gibi pürin metabolitleri hücre içinde birikmektedir. Bu metabolitlerin reperfüzyon sırasında ortama gelen moleküler oksijenin ksantin oksidaz tarafından kullanılarak meydana gelen reaksiyonları, İ/R hasarından dokuya göre değişen derecelerde sorumlu tutulan serbest radikallerin en önemli kaynağını oluşturmaktadır (24).

İskeminin süresi, şiddeti ve hücrenin tipine göre hasar geri dönüşümsüz hale gelerek hücre ölümü gerçekleşir. İskelet kasında geri dönüşümsüz değişiklikler 4-6 saat sonra oluşmaya başlar (25).

### **2.2.2.Reperfüzyon**

Oksijenin yeniden girişine izin veren reperfüzyon paradoksal olarak doku hasarını hızlandırır (4,5,25-27). Klinikte bu durum tromboliz, embolektomi, by-pass cerrahisi, organ transplantasyonu, turnike uygulamaları, replantasyon, mikrovasküler serbest doku aktarımı gibi durumlarda görülür. Mitokondriyal seviyede oksidatif fosforilasyonun yeniden kullanıma girmesi şeklinde ortaya çıkar. Bu sistem membran potansiyellerini düzeltir, yüksek hücre içi  $Ca^{2+}$ 'un ATP sentezini arttırması için mitokondriye akışını sağlar. Mitokondriler, yeterli ADP ve ATP varlığında, piridin nükleotidleri redükte durumdaysa yüksek konsantrasyonlarda  $Ca^{2+}$  depolayabilirler.

Ani oksijenlenme ile serbest oksijen radikalleri artar ve oksidatif stres oluşur. Mitokondriyal piridin nükleotidleri ve glutatyon seviyeleri düşer, mitokondri porları açılarak şişer ve sonuçta fonksiyonları bütünüyle inhibe olur (28).

Mitokondriler hücrede serbest radikallerin ana kaynaklarıdır (27). Serbest radikaller mitokondrilere çok hasar vermektedir. Bu nedenle stratejik olarak farmakolojik ajanlarla serbest radikal oluşumunun önlenmesi ya da ortamdan temizlenmesinin hücre hasarını azaltacağı düşünülmektedir (4).

### 2.2.3.Nötrofillerin Rolü

İskemi sürecinden sonra reperfüze olan bölgeye lökositlerin, özellikle polimorfonükleer lökositler (PNL) olan nötrofillerin infiltrasyonu reperfüzyon hasarının önemli bir nedenidir (2). Bilindiği gibi nötrofiller fagositoz olayı ile canlıyı enfeksiyöz ajanlardan koruyan kan hücreleridir. Yapılan çalışmalarda, iskemik hücrelerin, nötrofil ve trombositlerin vasküler endotele adhezyonuna dolayısıyla inflamatuvar yanıtı açan, kemoatraktan maddeleri ve adhezyon moleküllerini salgıladıkları gösterilmiştir (29,30). Nötrofil kemotaksisine neden olan en önemli etken, ksantin oksidaz (XO) reaksiyonu sırasında ortaya çıkan süperoksit anyon radikalleridir. Reoksijenasyon ile aktive olan ve lökosit akümüülasyonunda görev üstlenen diğer ajanlar ise, kompleman 5a (C5a) kompleman 3a (C3a), araşidonik asid metabolitleri, özellikle lökotrien B4 (LB4), nitrik oksit (NO), trombosit aktive edici faktör (PAF), interlökin -1, 6, 8 (IL-1, 6, 8), gamma interferon ve tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinlerdir (31). Kemotaktik faktörlerin sentezi ve salınması ile birlikte, hem nötrofil hem de endotel hücresinde lokalize olan adhezyon moleküllerinin artışında başlamaktadır. Nötrofil-endotel etkileşimini sağlayan adhezyon molekülleri, glikoprotein yapısındadırlar. Nötrofiller üzerinde bulunan bazı adhezyon molekülleri; lökosit  $\beta_2$  integrinler (CD11/CD18) ve lökosit adhezyon molekülü -1 (LAM -1 veya L-selektin) dir. Endotel hücresi üzerinde bulunanlar ise; intersellüler adhezyon molekülü -1 (ICAM-1), endoteliyal lökosit adhezyon molekülü-1 (ELAM-1 veya E-selektin) ve P-selektindir (30,32).

Nötrofiller, adhezyon molekülleri aracılığı ile etkileşime girdikleri endotel hücreleri arasında ilerleyerek (diapedez olayı) ekstravasküler dokuya doğru göç ederler. Aktive olmuş nötrofiller, antimikrobiyal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu

ile reperfüzyon sırasında gelen moleküler oksijeni kullanıp seri reaksiyonlar sonucunda süperoksit anyon radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ), hipoklorik asid (HOCl) ve kloraminleri oluşturarak, ileri doku hasarına neden olurlar (5). Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akışının geri dönmemesi fenomenine (*no reflow*), aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçları oluşturduğu bildirilmiştir (6). Nötrofiller bozulan mikrovasküler bariyerden, dokuya geçerken beraberinde damar içi sıvı da dokuya kaçarak, ödem oluşumuna neden olur. Geri dönüşsüz hasar, bu noktada " *No Reflow* " fenomeni ile ortaya çıkar. Bu fenomen mikrovasküler bariyerin bozulması ile dokuya kaçan sıvının, interstisyel basıncı arttırarak, kapillerleri sıkıştırması ve kan akımını durdurması şeklinde tanımlanır. Dokudaki kan akımı, kapiller düzeyde engellenerek, hücre beslenmesi bozulur (33).

Reperfüzyon hasarının patogenezinde lökosit infiltrasyonun sorumlu olduğu, birçok çalışma ile de kanıtlanmıştır. Antinötrofil serum, kemoterapotik kullanımı ya da radyasyona maruz tutularak lökopeni yapılan deney hayvanlarında, iskemi sonrası doku hasarının önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (34,35).

#### **2.2.4.Mast Hücresinin Rolü**

Mast hücreleri, bağ dokularında yerleşim gösteren granüllü hücrelerdir. Kemik iliğindeki CD34 (+) multipotent kök hücrelerden köken alır ve kanda öncü hücreler olarak dolaşırlar. Bağ dokularında bulunan mast hücreleri çok sayıda bazofilik granüller içerirler. Mast hücreleri genellikle yuvarlak ya da oval olup 20-30  $\mu$  çapındadırlar. Nukleusları merkezi konumdadır ve sıklıkla intrasitoplazmik granüller tarafından maskelenmiştir. Salgı granülleri 0.3 - 2.0  $\mu$  çapındadır. Bu granüller içerdikleri glikozaminoglikanların asidik radikalleri nedeniyle metakromatik olarak boyanırlar (36). Metakromazi, mavi renk ile pembe boyanmadır.

Kandaki öncü mast hücreleri derinin dermisi, akciğerler, bağırsakların mukoza ve submukozası gibi bölgelere göç ederek, buralarda çeşitli faktörlerin etkisiyle farklılaşıp olgunlaşırlar. Mukozal yüzeylerin epitelinde

veya lamina propriya'da bulunan mast hücreleri mukozal mast hücreleri (MMC) olarak adlandırılırlar. Ratta deri ve iskelet kaslarındaki serozal mast hücreleri (SMC) veya bağdoku mast hücreleri (CTMC) ile karşılaştırıldığında, MMC, histokimyasal, ultrastrüktürel ve fonksiyonel açıdan belirgin farklılıklar gösterirler. İnsanlarda ise MMC ve CTMC fenotipik ve fonksiyonel açıdan belirgin farklılık göstermezken granül proteazlarının kimaz veya triptaz olmasına göre bir heterojenite söz konusudur. Mast hücre granülleri başta heparin ve histamin olmak üzere triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, katepsin C ve G nötral proteazları gibi çeşitli mediyatörleri içerirler. Histamin ve heparine üçüncü büyük bir komponent olarak bağlanan nötral proteazlar, optimal olarak nötr pH'da fonksiyon gören ve peptit bağlarının koparılmasını katalize eden enzim grubudurlar (36). Proteazlar dört sınıfa ayrılırlar. Bunlar; serin proteazlar, metalloproteazlar, aspartik proteazlar ve sistein proteazlardır (36). Mast hücreleri, dış çevre ile yakın temas içinde olan sindirim sistemi, solunum sistemi ile deride, lenfoid organlarda, sinirler ve kan damarları çevresinde çok sayıda bulunurlar. Çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda; mast hücrelerinin granüllerinin içeriğini hücre dışına boşalttıkları bilinmektedir. Bu hücreler; İ/R hasarı, endotoksinler, çinko zehirlenmeleri, kolinerjik stimülasyon, hipertermi, inflamasyon ve hipersensitivite reaksiyonlarında degranüle olarak fonksiyon yaparlar (3,7).

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

inflamatuvar olaylara katıldığına işaret etmektedir (37). İskelet kası İ/R hasarında mast hücrelerinin önemli rol oynadığı tesbit edilmiştir. Mekanizma açık değildir ancak mast hücreleri yok edilmiş fare kaslarının İ/R reperfüzyon hasarına karşı dirençli olduğu bulunmuştur (3).

### **2.3.Serbest Radikaller**

#### **2.3.1.Serbest Radikalın Tanımı**

Serbest radikaller, dış orbitallerinde tek sayıda ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Dış orbitallerde ortaklanmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü artırdığı için serbest radikaller, çok kısa yaşam süreli ancak yapılarındaki dengesizlik nedeni ile çok aktif yapıldırlar ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliğine sahiptirler (5,38).

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler (5, 38):

1. Kovalent bağların homolitik kırılması.
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesi veya bir molekülün heterolitik kırılması.
3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.

Serbest radikaller çeşitli biyokimyasal reaksiyonları katalize ederler. Hücrenin mitokondrial enerji metabolizmasında, prostaglandin sentezinde, fagositozda, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol alırlar (5,38-40).

#### **2.3.2.Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Ürünleri**

Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürmeleri için mutlak gereklidir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir (Tablo 2.1). Daha az olarak karbon ve kükürt merkezli radikaller de vardır.

Oksidatif fosforilasyon sürecinde oksijenin çoğu en son suya indirgenir. Fakat bu süreçte metabolize olan oksijenin yaklaşık %1-3'ü tam olarak suya dönüşmez ve reaktif oksijen türleri olarak da adlandırılan yüksek derecede reaktif ürünler oluşur (5, 38,39,41).

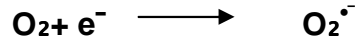


**Tablo 2.1** : Reaktif oksijen ürünleri ve kimyasal gösterimleri.

Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$
Perhidroksi radikali	$HO_2^{\cdot}$
Hidroksil radikali	$OH^{\cdot}$
Peroksil radikali	$ROO^{\cdot}$
Alkoksil radikali	$RO^{\cdot}$
Singlet oksijen	$^1O_2$
Nitrik oksit	$NO_2$
Peroksinitrit	$ONOO^-$
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$
Organik hidroperoksi	$ROOH$

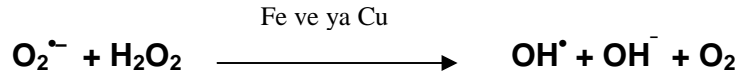
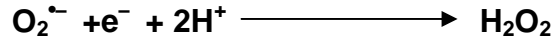
### 2.3.2.1.Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali, tüm aerobik hücrelerde oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir (5).



Süperoksit radikali; elektron transport zinciri, sitokrom P450 sistemi, hemoglobin ve katekolaminlerin oksidasyonu, ksantin oksidaz, prostaglandin metabolizmaları ve diğer çeşitli biyolojik reaksiyonlar sonucu oluşur (42). Başlıca kaynağı elektron transport zincirinde elektronların oksijene taşınması sırasında meydana gelen elektron sızıntısıdır (43). Bazı durumlarda süperoksit radikalinin yapımı hücrel fonksiyonlar için gerekli olmaktadır. Aktive edilen fagositik lökositler yabancı organizmaları öldürmek için bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve buldukları ortama verirler (5).

Genel olarak reaktivitesi düşük olan süperoksit radikalinin asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonları ile hidroksil radikali oluşturmak için reaksiyona girebilmesidir (5, 40).



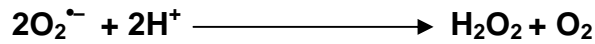
### 2.3.2.2.Perhidroksi Radikali

Bu radikal de çok reaktif olup, hücre membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir (38).

### 2.3.2.3.Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin iki elektron alması veya süperoksit radikalinin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti meydana getirir.

Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksit radikalinin dismutasyonu ile olur. Bu dismutasyon ya spontandır veya süperoksit dismutaz enzimi (SOD) tarafından katalizlenir (5).



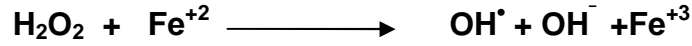
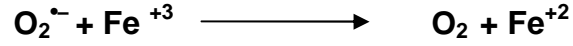
Memeli hücrelerinde hidrojen peroksit üreten enzimlerin büyük bir kısmı peroksizomlarda lokalize olmuştur (44). Biyolojik zarları kolayca geçebilen hidrojen peroksit, yapısında paylaşılmamış elektron içermediği için radikal özelliği taşımaz. Reaktif bir tür olarak bilinmesinin nedeni; Cu, Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalinin öncülü olmasıdır (38).

### 2.3.2.4.Hidroksil Radikali

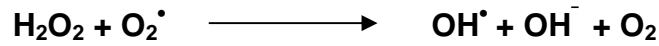
Reaktif oksijen türleri içerisinde bilinen en güçlü ve en reaktif radikaldir (5, 38). Yarılma ömrü çok kısadır ve bu nedenle oluştuğu yerde veya onun çok yakınlarında etkisini gösterir (5,40).

Hidroksil radikali canlılarda başlıca şu mekanizmalarla oluşabilir (5, 38) :

1) *Fenton reaksiyonu*: Hidrojen peroksit  $\text{Fe}^{+2}$  ve diğer geçiş metalleri varlığında indirgenerek  $\text{OH}^\bullet$  radikali meydana gelir.



2) *Haber-Weiss reaksiyonu*: Hidrojen peroksit, süperoksit anyon radikali ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur. Bu reaksiyon demir ve bakır tarafından katalizlenir.



3) Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur.

Hidroksil radikalleri canlı hücrelerde bulunan her moleküle saldırıp hasar verebilir. DNA ile etkileşimleri sonucu baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları gerçekleşebilir. Proteinlerde proteolitik yıkılmalara, fonksiyon bozukluklarına neden olabilirler. Hücre zarındaki yağ asitleriyle etkileşerek lipid peroksidasyonunu başlatırlar; bu durum da zar yapısının bozularak geçirgenliğinin artmasına ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilir (5,38).

### 2.3.2.5.Singlet Oksijen

Oksijenin elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucunda kendi dönüş yönünün ters yönünde olan farklı bir orbitale yer değiştirmesi sonucu oluşur.

Yapısında ortaklanmamış elektronu olmadığı halde serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır (5).

### 2.3.2.6.Nitrik Oksit (NO)

Damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz enzimi aracılığıyla L-arjinin'den sentezlenir. Yarılanma ömrü, moleküler oksijen ile hızlı reaksiyonundan dolayı atmosferik şartlar altında oldukça kısadır. Kan basıncı, guanilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Nötrofiller tarafından üretilen süperoksit anyon radikalinin oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (45). NO'in aşırı üretimi toksik etkili olabilir. NO'in kimyasal olarak aktivitesi yüksek değildir ancak belli şartlar altında oldukça toksik ürünler oluşturabilir. NO ve süperoksitin reaksiyona girmesiyle peroksinitrit meydana gelir. Peroksinitrit, direkt olarak proteinleri hasara uğratar ve hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>), azot dioksit (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) ve nitronyum iyonu (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) gibi toksik ürünlere dönüşür (40).

Peroksinitritin, protein tiol grupları, tirozin kalıntıları ve fosfolipidlere ilgisinden dolayı reaktivitesi yüksektir. Bu nedenle protein ve lipidlerin oksidasyonuna neden olur (46,47).

### 2.3.2.7.Peroksil Radikali

Poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonu sırasında meydana gelir ve yarılanma ömrü uzundur. Zincir reaksiyonunun ilerlemesini sağlar (48).

## 2.4.Hücrel Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları

### 2.4.1.Serbest Radikallerin Kaynakları

Reaktif oksijen ürünleri, aerobik canlılarda az miktarlarda ama sürekli üretilirler. Toksik etkilerden biyolojik ihtiyacın üzerinde üretilen radikaller sorumludurlar (38,49). Organizmada serbest radikal yapan olayların başlıcaları; mitokondrial elektron transport zinciri, ksenobiyotiklerin metabolizması, fagositik hücrelerin aktivasyonu, prostaglandin sentezi ve iyonize radyasyondur. Bunların yanısıra reaktif oksijen ürünlerinin hücrel metabolizmayı artıran aşırı egzersiz, kronik inflamasyon, enfeksiyonlar gibi durumlarda, çeşitli toksinlere ve ilaçlara maruz kalmada, stres, iskemi-reperfüzyon, travma, yaşlanmaya bağlı olarak da arttığı bilinmektedir (5,12,15, 41, 40,44,45,50).

### 2.4.2.Mitokondriyal Solunum Zinciri

Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zinciridir (5,38). Normal mitokondriyal solunum sırasında, %2 den daha az elektronun moleküler oksijene sızması ile süperoksit oluşur. Fizyolojik şartlar altında, oluşan süperoksidi nötralize edecek yeterli miktarda SOD vardır (51). SOD, süperoksitin spesifik yakalayıcısıdır.

### 2.4.3.Araşidonik Asit Kaskadı

Araşidonik asit siklooksijenaz ve lipooksijenaz ile metabolize olarak prostoglandin, prostosiklin, tromboksan ve lökotrienleri içeren çeşitli vazoaktif ürünleri oluşturur. Siklooksijenaz, 2 molekül oksijenin doymamış yağ asidine katılmasını katalizler ve prostoglandin G (PGG) oluşturur. PGG hızla prostoglandin H (PGH)' ye okside olur, bu sırada süperoksit radikali oluşur. Lipooksijenaz yoluyla da OH<sup>•</sup> radikalleri oluşabilir (52,53).

### 2.4.4.Ksantin Oksidaz (XO)

İskemi reperfüzyon sırasında en önemli serbest radikal kaynağıdır (54,55). XO, memeli dokularında bulunan, birçok endojen ve eksojen kaynaklı substratın oksidasyonuna katılan bir enzimdir. Organizmada pürin bazlarının son oksidasyonu ve demirin gastrointestinal sistemden emiliminde rol oynar.

Bu enzim, sağlıklı hücrelerde oksidize nikotinamid dinükleotid ( NAD<sup>+</sup>) e bağımlı dehidrogenaz ( XDH, D formu ) halinde bulunur. Enzimin bu formu pürinlerin oksidasyonu sırasında elektron alıcısı olarak moleküler oksijen yerine nikotinamid dinükleotid (NAD<sup>+</sup>) i kullanır ve reaktif serbest oksijen radikali üretmez. İskemi sırasında XDH, oksidan üreten XO (D den O ya dönüşüm) formuna dönüşür (56). İskemi sürecinde, hücre içindeki ATP, hipoksantin ve ksantine dönüşerek hücrenel enerji miktarında azalmaya neden olur. Hipoksantin ve ksantin, XO için iyi birer substrattırlar. Reperfüzyonun başlaması ile ortama katılan moleküler oksijen, iskemik süreçte birikmiş olan hipoksantin ve ksantin ile XO aracılığı ile reaksiyona girerek, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> açığa çıkarır.

XDH dan XO a dönüşüm 2 yolla gerçekleşir:

1. XDH ın tiol gruplarının oksidasyonu ile geri dönüşümlü olarak.

2. İskemi sırasında artan hücre içi kalsiyum ile aktive olan proteaz ile enzimin bir kısmının proteolizi sonucu geri dönüşümsüz olarak.

İskeminin yol açtığı D den O ya dönüşüm farklı organlarda farklı hızlarda gerçekleşir. Barsak ve karaciğerde bu dönüşüm, çok kısa süreli iskemilerde bile olabilirken, iskelet kası ve deride daha uzun süreler gerektirir. Rat iskelet kasında bu dönüşüm için en az 1 saatlik iskemi periodu gerekir. Oluşan XO miktarı iskemi süresi ile doğru orantılıdır; iskemi süresi arttıkça oluşan XO miktarı da artar (57).

XO enziminin, meme epitel hücrelerinde kapiller endotel hücrelerinde yoğunlaştığı, kapiller endotel hücrelerindeki XO aktivitesinin aynı dokudaki diğer hücrelerden 100 kat fazla olduğu tesbit edilmiştir (58). XO ın bu lokalizasyonu, iskemi-reperfüzyon hasarı için ayrı bir önem taşımaktadır.

Reperfüzyonun başlaması ile endotel hücreleri moleküler oksijen ile ilk temas eden hücreler olur. Bundan dolayı kapiller endotel hücreleri, reperfüzyon hasarından ilk etkilenen hücrelerdir. Bu nedenle ile serbest oksijen radikallerinin ana üretim merkezi olmaları muhtemeldir. Kapiller endotel hücrelerinin hasarı bir kemotaktik stimulus halini alır (59).

XO inhibitörleri ( örneğin: Allopürinol, süperoksit dismutaz ) ile yapılan birçok çalışmada, bu maddelerin reperfüzyon hasarını azalttığı tesbit edilmiştir (60,61).

## **2.5.Hücre Dışı Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları**

### **2.5.1.Katekolaminler**

İskemi sırasında ve flep oluşturulurken sempatik sinir uçlarından bölgesel katekolamin salınımı artar. Bu fazla miktarda katekolamin monoaminooksidaz ile yıkılır ve sonra fazla miktarda elektronun olduğu oksidasyona uğrar. Moleküler oksijen bir elektron alarak  $O_2^{\bullet-}$  radikalleri oluşur (62).

### **2.5.2.Polimorfonükleer Lökositler (PNL)**

Aktive nötrofiller, bakterisidal rollerinin bir kısmı olarak zorunlu şekilde süperoksit üretirler. Yüzeylerindeki NADPH oksidaz,  $O_2^{\bullet-}$  oluşumundan sorumludur (62).

Nötrofiller, myeloperoksidaz aktivitesine de sahiptirler ve  $H_2O_2$  ile  $HOCl^{\bullet}$  radikali oluştururlar. Makrofajlarda nitrik oksit sentaz sisteminin  $OH^{\bullet}$  oluşturduğu da gösterilmiştir. Radikaller yalnızca plazma membranı ile bakteri arasındaki yüzünde oluşmasına rağmen, bir miktar reaktif oksijen ürününün kaçıışı olmaktadır.

### **2.6.Serbest Radikallerin Etkileri**

Serbest radikaller nükleik asitler, serbest aminoasitler, proteinler, lipidler, lipoproteinler, karbonhidratlar ve bağ dokusu molekülleri de dahil olmak üzere, canlı organizmadaki hemen hemen tüm biyomoleküllerle reaksiyona girerek bunlar üzerinde geridonüşümlü ya da geridonüşümsüz etkiler meydana getirirler. Çeşitli patolojik durumlarda normalden fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşmasıyla ya da organizmanın antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla artan serbest radikaller, hücrenin çeşitli bileşenlerini etkileyerek hücre hasarına yol açarlar. Bunun sonucunda, hücrelerde ve dokularda yapısal değişiklik ve fonksiyonel kayıplardan hücre ölümüne kadar gidebilen pek çok olumsuz sonuçlar ortaya çıkar (5,63).

#### **2.6.1.Hücre İçi Etkileri**

##### **2.6.1.1.Membran Lipidleri Üzerine Etkileri**

Serbest radikallere hedef yapılardan birisi hücre membranı lipidleridir. Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan, membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipid yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır. Hücre membranlarının oksijen radikallerine maruz kalması lipid peroksidasyon reaksiyonlarını uyarır. Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikalın hidroksil radikali olduğu düşünülmektedir (63,64).

Lipid peroksidasyonu; kendi kendini devam ettiren bir serbest radikal zincir reaksiyon mekanizması şeklinde ilerler. Yağ asidi ile birleşen radikal, bir dizi tepkimeyi başlatmaktadır (65).

Peroksidasyona en duyarlı olanlar doymamış yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan serbest radikal etkisiyle membran yapısında bulunan doymamış yağ asit zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar (5).

Serbest radikal etkisiyle doymamış yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olur. Bu karbon merkezli radikaldir. Böylece oluşan lipid radikali ( $L^{\bullet}$ ) dayanıksız bir bileşik olduğundan bir dizi spontan değişikliğe uğrar. Özellikle, molekül içi çift bağ aktarımı ile dien konjugatları oluşturarak stabil olmaya eğilimlidir. Lipid radikalının moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi sonucu lipid peroksil radikali ( $LOO^{\bullet}$ ) meydana gelir. Bu radikaller membran yapısındaki doymamış yağ asitlerini etkileyerek bir başka lipid molekülünün yan zincirinden hidrojen atomu çıkarmak suretiyle yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlarlar ki buna ilerleme basamağı denir ve kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerini ( $LOOH$ ) oluştururlar. Böylece reaksiyon, kendi kendine katalizlenerek devam eder (63).

Demir iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Demir iyonunun kendisi bir radikaldir ve doymamış yağ asitlerinden  $OH^{\bullet}$  radikali oluşturarak lipid peroksidasyon başlangıç reaksiyonuna neden olur.

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sonlanır. Bu ürünlerin başlıcaları MDA ve 4-hidroksinonenal'dir. Meydana gelen aldehitlerden en önemlisi olan MDA, lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde sık olarak kullanılır (63,64).

Hücre membranlarında meydana gelen lipid peroksidasyonu, membran organizasyonunu bozarak hücrenin yapısının bozulmasına neden olur. Peroksidasyon sırasında oluşan lipid peroksitler, hücresel hasara yol açan, metabolizmayı değiştiren ve dokulardaki kan akımını azaltan güçlü kimyasal maddelerdir. Bu ürünler, lipidlerin dışında karbonhidratların, proteinlerin ve DNA'nın yapısını da etkileyerek denatürasyonuna, enzim inaktivasyonuna,



DNA sarmal kırıklarına ve baz modifikasyonuna neden olur. Bu değişiklikler de birçok patolojik olaylara zemin hazırlar. Lipid hidroperoksitlerinin yüksek konsantrasyonları; kanser, kalp hastalıkları, diyabet gibi yaşla ilişkili hastalıkların çoğunda artmış risk ile ilişkili bulunmuştur (66).

#### **2.6.1.2. Proteinler Üzerine Etkileri**

Proteinler, radikallerin etkilerine lipidlere oranla daha az hassastır. Serbest radikallerin proteinleri etkileme derecesi aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Proteinin hücre sel lokalizasyonuna ve radikal in toksisite gücüne göre protein hasarının boyutları değişebilir. Sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı çok fazladır. Sistin, histidin, metionin, triptofan, tirozin içeren proteinler oksidanlara en duyarlı olanlardır (5,63).

Serbest radikallerin proteinlere saldırması histidin, lizin, arjinin, prolin gibi bazı aminoasitlerde hasara yol açabilir. Proteinlerin bazı aminoasitlerinin oksidatif hasarı, protein karbonil ürünlerinin oluşumuna neden olabilir. Protein karbonilleri, genel oksidatif stresin göstergesi olarak kullanılabilirler (67). Gelişmekte olan doku ve yeni sentez edilen proteinler üzerinde serbest oksijen radikallerinin daha da toksik bir etkiye sahip oldukları bildirilmiştir (60).

Reseptörler, sinyal transdüksiyon mekanizmaları, transport sistemleri ve enzimleri içeren çeşitli hücre sel fonksiyonlar proteinlerin radikal hasarından dolayı etkilenebilir (63).

#### **2.6.1.3. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri**

Serbest radikallerin hücre çekirdeğinde ve DNA'da etkileri genotoksik ve mutajenik değişikliklere yol açar. DNA'nın nükleik asitleri ile reaksiyona giren serbest radikaller, DNA dizininde çatlaklar meydana getirerek bu hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine neden olurlar. Oksidatif DNA hasarı, büyük ölçüde yaşlanma ve kanser gelişimine katkıda bulunur (68-70).

#### **2.6.1.4.Karbonhidratlar Üzerine Etkileri**

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitler meydana gelir. Açığa çıkan okzoaldehitler, proteine bağlanabilme özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterirler (5).

#### **2.6.2.Hücre Dışı Etkiler**

##### **2.6.2.1.Kemotaksi**

Serbest radikaller, endotel hücrelerinden kemotaktik faktör ya da proinflamatuvar moleküller olarak adlandırılan histamin, PAF, LTB4 salınımına yol açarlar (55). Bu kemotaktik faktörlerin etkisi, dolaşımdaki lökositlerin patoloji bölgesinde yoğunlaşmalarını ve endotel ile ilişkilerinin artmasını sağlamaktır.

##### **2.6.2.2.Rolling**

Normal koşullarda dolaşımdaki lökositler, damar endotelini ile nadiren temasta bulunurlar. Endotelin, İ/R ile oluşan radikaller tarafından uyarılması sonucu lökositler ve özellikle de nötrofiller, kendi etraflarında yuvarlanmaya başlarlar. Yuvarlanma olayını, aynı gruptan üç molekül yönlendirir. Bunlar lökositlerde bulunan L-selektin, endotel hücrelerinde yer alan P ve E-selektindir (32). L-selektin, lökositlerin çoğunda bulunmakla beraber en yoğun olarak bulunduğu grup nötrofillerdir. L selektin, aktive olmamış nötrofillerin uyarılmış endotel hücrelerindeki P ve E selektinlerle birleşip ilk rolling olayının başlamasından sorumludur. L, P ve E selektinlerin etkileşimi sonucu lökositlerde yuvarlanma olayı gerçekleşir.

##### **2.6.2.3.Adhezyon**

Serbest radikaller, nötrofil ve endotel hücrelerinden selektin moleküllerinin yanı sıra adhezyon moleküllerinin de açığa çıkmasını sağlar. CD11/CD18, lökosit integrini olarak bilinir ve nötrofiller tarafından daha çok salınan, adhezyon yönlendiren bir moleküldür.

Adhezyon olayı yalnızca lökositler arasında gerçekleşen bir olay değildir. Endotel hücrelerinin de bu olayda rolü büyüktür. ICAM-1, endotel hücreleri tarafından salınır ve lökosit CD11/CD18'in karşılığıdır. ICAM-1'in salınımını, iskemi-reperfüzyon patogeneğinde iskemi sonrası nötrofil-endotel hücresi adezyonunun moleküler düzeyde en önemli belirleyicisidir (29). CD11/CD18 ve ICAM-1'in reaksiyona girmesi, endotel hücresine yapışan nötrofillerden, iskemik dokuya direk radikal transferini hızlandırır. Bu geçiş, kapiller düzeyde endotel hücrelerinin arasının açılarak damarın bariyer yapısını yitirmesine, oluşan aralıklardan nötrofillerin dokuya kaçması şeklinde gerçekleşir (29).

#### **2.6.2.4. Antiadhezyon Molekülleri İnhibisyonu**

Serbest oksijen radikalleri, NO'ü inhiye ederler. NO, kararsız bir nitrat bileşimidir. Damarlarda gevşemeye sebep olması, ilk tesbit edilen fonksiyonu olmakla beraber organizmada birçok biyolojik olayda görev alır. Kas, deri, barsak ve kalp gibi birçok organ sisteminde var olduğu bilinmektedir. Endotel hücreleri, lökositler gibi pekçok hücreden salınabilir. NO, lökosit endotel adhezyonunu önleyen en önemli endojen moleküldür. Ancak NO salınımı, reperfüzyon hasarı sürecinde ortaya çıkan süperoksitin, endotel hücrelerine etkisi ile inhiye olur (30).

Adhezyondan sonra özellikle nötrofiller endotel hücrelerinin arasından diapedez ile dokuya geçerek burada birikirler ve aktif oksijen (respiratuvar patlama), proteolitik enzim ve inflamatuvar sitokinlerle doku hasarını başlatırlar (71).

#### **2.7. Antioksidan Savunma Sistemi**

Organizmada fizyolojik ya da patolojik yollarla sürekli şekilde serbest radikaller oluşmaktadır. Antioksidanlar reaktif oksijen ürünlerini ve meydana getirdiği hasarları önleyen bileşiklerdir (72). Serbest radikallerin ileri derecede reaktif olmaları, yarı ömürlerinin kısa olması ve düşük yoğunlukta bulunmaları nedeniyle tespit edilmeleri oldukça güçtür. Koruyucu antioksidan savunma sistemi elemanlarının incelenmesi ya da hücrenel lipidlerle, proteinlerle ve

DNA ile reaksiyonları sonucu oluşan çeşitli son ürünlerin ölçülmesi gibi indirekt metodlar kullanılır (5).

Antioksidanların başlıca etkileri şu şekilde olmaktadır:

1. Reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunun engellenmesi.
2. Reaktif oksijen ürünlerinin enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi.
3. Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi.
4. Hedef moleküllerinin hasar sonrası tamiri.

**Tablo 2.2** : Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

ENZİMATİK	ENZİMATİK OLMAYAN	
Süperoksit dismutaz	Glutasyon	Flavonoidler
Katalaz	$\alpha$ - tokoferol (vitamin E)	Metal bağlayıcılar
Glutasyon transferaz	Askorbik asit (vitamin C)	Melatonin
Glutasyon peroksidaz	$\beta$ -karoten (vitamin A)	Bilirubin
Glutasyon redüktaz	Ubikinonlar (Koenzim Q)	Diğerleri (sitokinler, aminoasitler)

### 2.7.1. Enzimatik Antioksidan Savunma

#### 2.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit anyon radikalinin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.



Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit anyon radikalinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Bu reaksiyon oksidatif strese karşı ilk savunma olarak da adlandırılır. Çünkü süperoksit, zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem

sayesinde hücrel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulur (5).

Ökaryotlarda üç SOD izoenzimi tanımlanmıştır:

- 1) Sitozolik Cu/Zn-SOD
- 2) Mitokondrial Mn-SOD
- 3) Ekstrasellüler SOD (EC-SOD)

Genel olarak hücrede en çok bulunan izomer sitozolik Cu/Zn-SOD'dur. Bu formun antioksidan savunmanın ilk aşamasında temel bir rol oynadığına inanılır. Minör bir fraksiyon olan Mn-SOD, sitoplazmada ve mitokondrial matrikste bulunur. EC-SOD, dokuların interstisiyel boşluklarında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunmuştur. Plazma, lenf sıvısı ve sinoviyal sıvıdaki SOD aktivitesinin büyük bir kısmından sorumludur (49,68).

#### **2.7.1.2.Katalaz**

Hücrelerin peroksizomlarında lokalize olan ve yapısında dört hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığıyla oluşmuş olan  $H_2O_2$ , radikal olmamasına karşın, en reaktif radikallerden birisi olan  $OH^*$  radikalinin öncüsüdür. Bu nedenle birçok reaktif oksijen ürününden daha fazla oksidatif hasara neden olur. Katalaz,  $H_2O_2$ ' yi su ve moleküler oksijene dönüştürür (5).

#### **2.7.1.3.Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)**

Sitoplazmada ve mitokondride bulunan bu enzim, yapısında aktivasyonu için gerekli selenyum içermektedir.  $H_2O_2$ , organik hidroperoksitlerin ( ROOH ) indirgenmesini katalizler (5, 49, 62).

#### **2.7.1.4.Glutatyon S Transferaz**

Dimerik yapıda olup sitoplazmada bulunur. Çok sayıda izoenzimi vardır ve biyotransformasyonda rol oynar (73).

## 2.7.2.Enzimatik Olmayan Antioksidan Savunma Sistemleri

### 2.7.2.1.Glutasyon (GSH)

GSH pek çok dokuda yüksek düzeyde bulunan intrasellüler antioksidandır. Serbest radikallerin hedeflerinden birisi proteine bağlı ve eriyebilir sülfidril gruplarıdır. GSH, protein yapısındaki sülfidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok protein ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Ayrıca ksénobiyotiklerin metabolizmasında rol oynar (5).

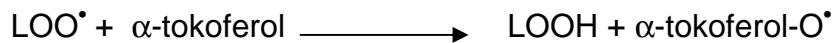
### 2.7.2.2.Askorbik Asit (C Vitamini)

Hidrofilik yapıda güçlü antioksidan bir vitamindir. Süperoksit, hidroksil ve singlet oksijeni yakalayarak etkisizleştirir (73).

E vitaminin ve redükte glutasyonun rejenerasyonunu sağlayarak yeniden kullanıma sokar (5).

### 2.7.2.3.E Vitamini

E vitamini, majör lipofilik bir antioksidandır. Membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur. Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek zincir kırıcı bir etkiyle lipid peroksidasyonunu önler. Tokoferol ve tokotriol türevlerini kapsayan vitamin E'nin antioksidan özelliği en yüksek formu  $\alpha$ -tokoferoldür.



E vitamini, süperoksit radikali ve hidroksil radikallerini, singlet oksijen gibi reaktif oksijen ürünlerini indirger, nitrik asit ile de reaksiyona girebilir (5).

### 2.7.2.4.Karotenoidler

A vitaminin ön maddesi olan  $\beta$ -karoten singlet oksijeni baskılar, süperoksit ve peroksil radikalini temizler (5).

### 2.7.2.5.Melatonin

Lipofilik yapıda olup en reaktif radikallerden birisi olan OH<sup>\*</sup> radikali ile direkt reaksiyona girer ve bir kation radikaline dönüşür. Bu radikal ise süperoksit radikalini yakalayarak antioksidan etki gösterir (5).

## 2.8.Flavonoidler

### 2.8.1.Yapıları ve Genel Özellikleri

Flavonoidler, bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan yararlı biyokimyasal ve antioksidan etkileri olan bileşiklerdir. 15 C atomlu 2 fenil-benzopiron (difenil propan) yapısı gösterirler. Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak adlandırılırlar. Yapısal olarak genellikle C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> karbon iskeleti ve A, B, C halkaları vardır. Flavonoidler moleküler yapılarına göre başlıca antosiyoninler, flavanlar, flavanonlar, flavonlar, flavonoller ve isoflavonoidler şeklinde sınıflandırılır. Yaklaşık olarak 4000'den fazla flavonoid türü belirlenmiştir (8,74). Flavonoidler başlıca sebzeler, meyveler, kırmızı şarap, çay, soğan baklagillerde bulunur ve çoğu çiçeklerin, meyvelerin rengini verir.

Flavonoidlerle ilk kez 1930'lu yıllarda ilgilenilmeye başlanmış, 1960'lı yıllarda ise gıda koruyucu olarak kullanılmışlardır. Flavonoidlerin en önemli etkilerinden birisi serbest radikalleri temizleme özellikleridir (8,74). Hemen her flavonoid grubunun en iyi tanımlanmış özelliği antioksidan kapasiteleridir.

Serbest radikallerin üretim artışı bu endojen temizleyici bileşiklerin (süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler) kullanılıp azalmasına yol açar. Flavonoidler, endojen temizleyici bileşikler benzeri etki oluşturarak endojen antioksidan savunma sistemlerini desteklerler. Flavonoidlerin direkt radikal temizleme özellikleri vardır (8,15,75).

### 2.8.2.Quercetin

#### 2.8.2.1.Genel Özellikleri

En iyi tanımlanmış flavonoidlerden biri olan Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon), sebze ve meyvelerde bulunan bileşiktir. Başlıca elma, soğan, brokoli, çilekçiller, yeşil bezelye ve çayda bulunur. Batı diyeti yaklaşık

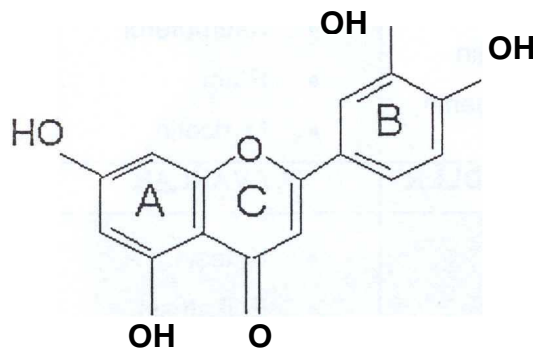
25 mg/gün flavonoid içerir; Quercetin 16 mg/gün ile bu diyetle flavonoidlerin en büyük bileşenini oluşturur (8,15). Flavonoidler ve Quercetin gıdalarda genellikle glikozid şeklinde bulunan büyük moleküllü yapılardır. Bu özelliklerinden dolayı barsaklarda emilmeleri zordur. Gastrointestinal sistemde serbest fenolik kısım ayrılır. Çünkü bunların bağırsaktan emilebilmesi için küçük molekül ağırlıklı formlara dönüşmeleri gerekir. Bağırsaklarda bulunan mikroorganizmalar, flavonoid glikozidlerinin çözülmesini gerçekleştirirler. Yaklaşık %1'i bozulmadan, büyük bir kısmı ise çeşitli hidroksiaromatik asitlere dönüştürülerek böbreklerden atılır (8,76,77). Quercetin'in distribüsyon yarı ömrünün 3.8 saat, eliminasyon yarı ömrünün 16.8 saat olduğu bildirilmiştir (15).

### 2.8.2.2. Antioksidan Özellikleri

Quercetin'in diğer flavonoidlere göre antioksidan etkinliği oldukça güçlüdür. Flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme ve antioksidan özellikleri, yapılarında bulunan üç gruptan ileri gelmektedir (Şekil 2.8).

Bu yapısal gruplar şunlardır:

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



**Şekil 2.8 :** Quercetin'in yapısı ve antioksidan özellik gösteren grupları.

B halkasındaki hidroksilasyon, antioksidan aktiviteye katkıda bulunur. Tüm flavonoidler 3'-4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye



sahiptir. Polifenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri molekül içerisindeki hidroksil grubu sayısına bağlıdır. Flavonoidlerin elektron verici özellikleri yoğun bir şekilde araştırılmış ve antioksidan özelliklerinin açıklanmasında kullanılmıştır (75,77).

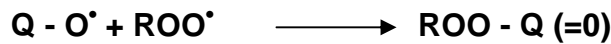
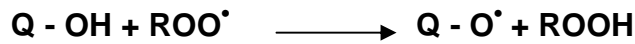
Quercetin yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir ve hücrede serbest radikalleri şu şekilde temizler:

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

b)  $OH^{\cdot}$  radikalinin temizlenmesi: Bu etkilerini metal iyonlarının şelasyonu aracılığıyla gerçekleştirirler (8,14,15).

c) NO'nin,  $O_2^{\cdot-}$  radikali ile etkileşmesi sonucu  $ONOO^{\cdot}$  meydana gelir. Quercetin,  $O_2^{\cdot-}$  radikalini temizleyerek peroksinitrit radikalinin üretimini baskılayabilir (69,83). NO moleküllerinin flavonoidler tarafından direkt olarak temizlendikleri de bildirilmiştir (9).

d) Lipid peroksil radikali ( $ROO^{\cdot}$ ) ile reaksiyona girerek zincir kırıcı bir etki ile lipid peroksidasyonunun inhibisyonu yaparlar.



Quercetin ( $Q - OH$ ), lipid peroksil radikali ( $ROO^{\cdot}$ ) ile reaksiyona girerek onu indirgerken kendisi daha kararlı bir radikal yapı ( $Q - O^{\cdot}$ ) oluşturmaktadır. (8,15,77).

e) Quercetin lipofilik bir antioksidandır ve lipid tabakalarının arasına yerleşerek lipid hasarını önleyici etkiye sahiptir (10,15).

Flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme özelliklerine ilave olarak antiinflamatuvar, antiviral, antialerjik, antitrombotik, antiaterosklerotik, antitümoral etkileri içeren çeşitli biyolojik özellikleri de vardır (8, 10, 11, 15, 77). Flavonoidler XO, fosfolipaz- $A_2$ , siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu, lökosit adhezyonun ve aktivasyonunun azaltılması, mast hücresi degranülasyonunun inhibisyonu gibi etkileriyle antiinflamatuvar özellik gösterirler (8,15). Flavonoidler ve özellikle Quercetin, karsinogenlerin

biyoaktivasyon sürecini inhibe ederek ve LDL oksidasyonunun engellenmesi yoluyla antikarsinogenik ve antiaterosklerotik etkilidirler (8,10,15,77). Flavonoidlerin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkileri epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir ve flavonoid alımının mortalite ile ters ilişkili olduğu bulunmuştur (15). Radikal aracılı hasar sonucu oluşması muhtemel pek çok hastalıktan korunmada flavonoidlerin etkin bir rol oynayabilecekleri düşünülebilir (8,15,77).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Deney Protokolü

Çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde bulunan Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezinde (TİCAM), Etik Kurul ve Deney Hayvanları Alt Komisyonu onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi (Tarih : 03/05/2006, Sayı: 2006/316).

Deneyde, ağırlıkları 150 -200 gram arasında değişen 5 aylık, 21 adet, erkek, Wistar cinsi rat kullanıldı. Ratlar deney öncesinde standart rat yemi (Oğuzlar Yem, Eskişehir) ve su ile beslendi. Deney, normal gün ışığından faydalanan, 18-20 C sıcaklığa sahip laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmamızda piyasada ilaç halinde de bulunan Quercetin (Quercetin Complex, Antioxidant, Solgar Vitamins Ltd. USA) etken maddesi kullanıldı.

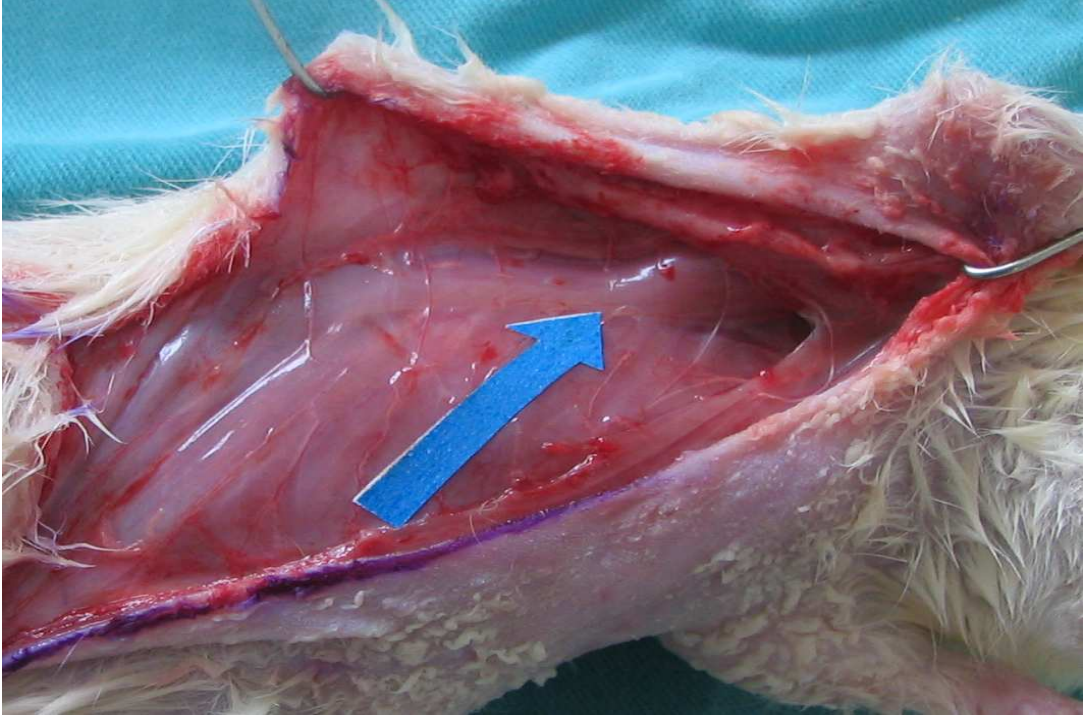
Ratlar her grupta 7 adet olacak şekilde; kontrol (K), iskemi-reperfüzyon (İ/R), iskemi-reperfüzyon ve Quercetin (İ/R+Q) olmak üzere 3 eşit gruba ayrıldı.

Tüm ratlara anestezi olarak 30 mg/kg tiopental sodyum (Pentobarbital Sodium, 0,5g, Abbott) intraperitoneal olarak uygulandı. Bütün gruplara cerrahi girişim öncesi antikoagülasyon amacı ile 150 İÜ/kg heparin (Nevparin, 5000 İÜ/ml, Mustafa Nevzat) intraperitoneal olarak yapıldı. Ratların sağ aksiller bölgeye komşu sırt ve göğüs derileri betadinle (%10 povidon iyot çözeltisi) temizliği takiben traşlandıktan sonra, Bayramiçli (19) tarafından belirtildiği şekilde sağ latissimus dorsi kası torakodorsal arter pediküllü flep olarak kaldırılmak üzere ön aksiler çizgiden sağ kalçaya doğru uzanan kıvrımlı insizyonla ortaya konuldu (**Şekil 3.1**). Kasın serratus anterior kasından gövde bağlantılarını ayırmak için lateral kenardan altına girildi. Bu seviyede vasküler yapılar ortaya kondu (**Şekil 3.2**). Kas tam olarak dekole edildikten sonra dorsolomber ve vertebral bağlantılar kesildi. Distalden proksimale doğru kaldırılan kasın humeral tendonu pediküle zarar vermeden kesildi. Böylece kas sadece vasküler pedikülü kalacak şekilde hazırlandı (**Şekil 3.3**). No flow iskemi oluşturmak için pediküle standart mikrovasküler klemp konuldu (**Şekil 3.4**). Deney bitiminde tüm ratlar yüksek doz (100 mg/kg ) tiopental sodyum uygulanarak feda edildi. Noniskemik kontrol grubunda kas

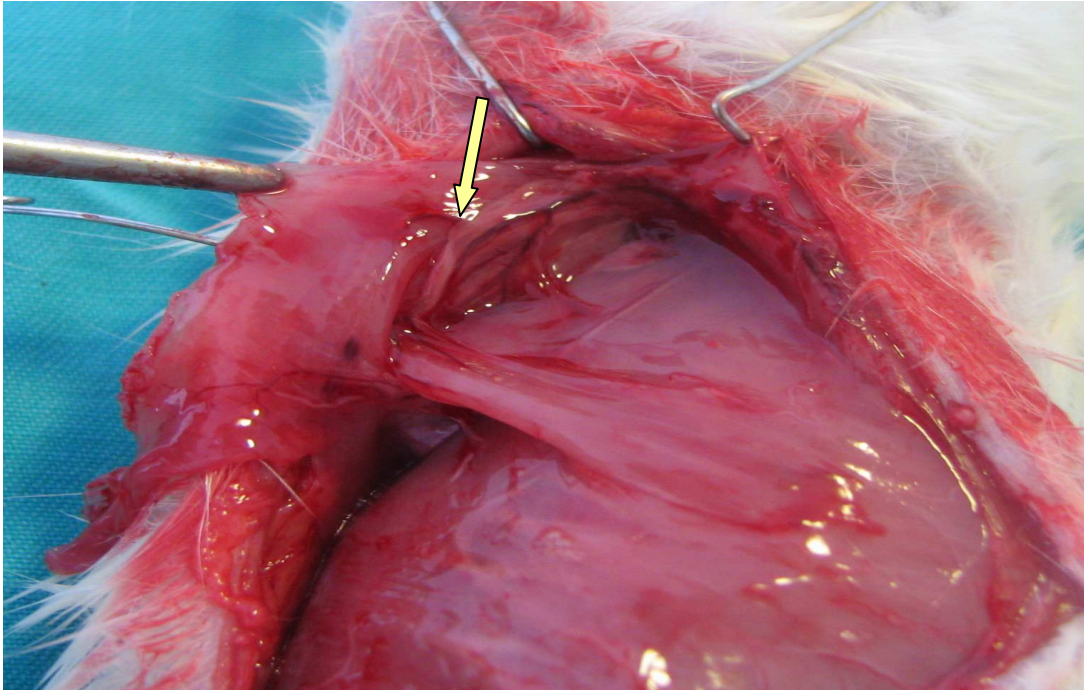
uzun aksından kesilerek iki parça halinde çıkarıldı. Her bir parça histolojik ve biyokimyasal tetkikler için saklandı. I/R grubunda ise 4 saatlik normotermik no flow iskemi ve 2 saatlik reperfüzyonu takiben kas iki parça halinde çıkarıldı. Quercetin grubunda (I/R+Q) iskemiden 1 saat önce 50 mg/kg Quercetin intraperitoneal olarak verildi ve 4 saatlik normotermik no flow iskemi sonrası 2 saat reperfüzyona maruz bırakıldı. Reperfüzyonu takiben kas yine uzun aksından kesilerek iki parça halinde çıkarıldı. Biyokimyasal tetkikler (MDA ve SOD) için alınan kas parçaları sıvı azot içinde şok dondurularak transfer edilip -80 derecede derin dondurucuda saklandı. Histolojik inceleme için doku parçaları nötral formalinde saklandı.

### **3.2.İstatistiksel Verilerin Analizi**

Biyokimyasal sonuçlar ve histolojik olarak sayılan nötrofil ve mast hücre sonuçları SPSS 13.0 windows programında analiz edildi. SOD ve MDA düzeyleri ile nötrofil ve mast hücre sayılarının karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis Testi ve Tek Yönlü Varyans Analizi; degranüle mast hücreleri ile nötrofil hücreleri arasındaki ilişki için Spearman Korelasyon Analizi ve mast hücrelerinin granüllü degranüllü oranlaması için Wilcoxon T Testi kullanılmıştır. Mast hücrelerinin granüllü ve degranüllü oranlarının karşılaştırılmasında normal dağılım varsayımı için Arcsin  $\sqrt{x}$  dönüşümü yapılmıştır.

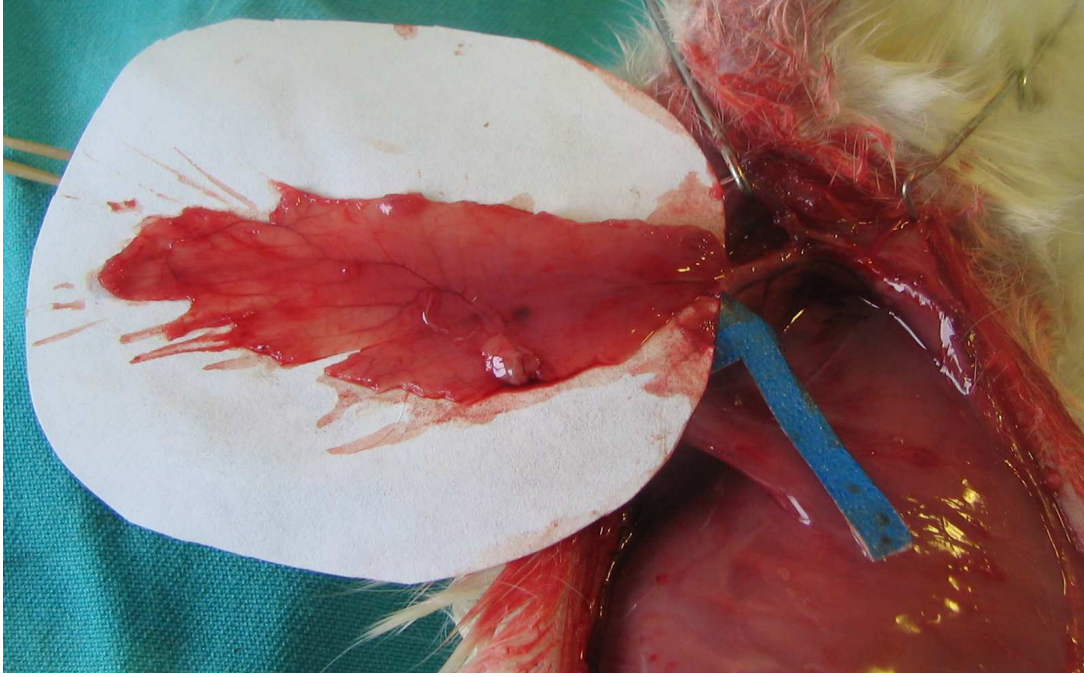


**Şekil 3.1** : Latissimus Dorsi Kası.

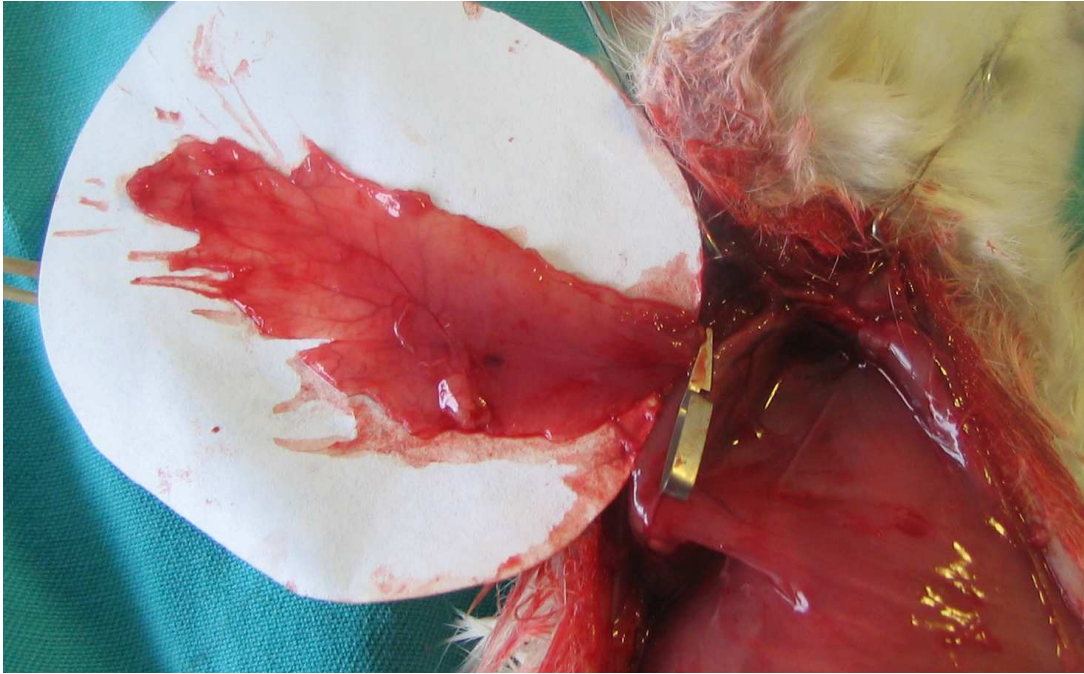


**Şekil 3.2** : Latissimus dorsi kası kısmen kaldırılmış, torakodorsal arter pedikülü izleniyor.





**Şekil 3.3 :** Latissimus dorsi kasının pedikül üzerinden tamamen kaldırıldıktan sonraki görünümü.



**Şekil 3.4 :** Latissimus dorsi kası pedikül üzerinden tamamen kaldırıldıktan sonra mikrovasküler klemp ile pedikülün total oklüzyonu.

### 3.3.Histolojik Yöntem

Latissimus dorsi'den alınan kas örnekleri nötral formalinde 24-48 saat fikse edildikten sonra rutin takip yöntemleri uygulanarak parafin blokları elde edildi. Bloklardan mikrotom yardımı ile 5 mikron kalınlığında alınan kesitlere genel yapı özellikleri ve nötrofil infiltrasyonunu incelemek için hematoksilin-eosin boyası, mast hücrelerini incelemek için ise toluidine mavisi boyası yapıldı. Mast hücreleri ve nötrofiller her hayvana ait rastgele seçilmiş 25 kesitte ve her kesitte 50 alanda ( $2000\mu\text{m}^2$ lik) olmak üzere oküler mikrometresi yardımıyla Olympus CH70 marka mikroskopta X40 büyütme ile sayıldı. Sayım işlemini tek histolog yürüttü. Mast hücreleri granüle ve degranüle mast hücreleri olarak gruplandırıldı. Tüm görüntüler DP70 kamera takılı Olympus PM 10 ADS fotomikroskop ile görüntülendi.

### 3.4.Biyokimyasal Yöntem

#### 3.4.1.Doku Malondialdehid Düzeyinin Ölçümü

MDA ölçümü, Ohkawa ve arkadaşlarının MDA'nın asidik ortamda tiobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi prensibine dayanan yöntemi uygulanarak yapıldı (78). Doku örneğine 1/10 1.15 N KCL tamponu eklenerek homojenizat hazırlandı. Doku protein içeriği biüret yöntemi ile saptandı. 0.4 ml homojenizat üzerine %8.1 sodyum dodesil sülfattan 0.2 ml, pH'sı 3.5 olan %20'lik asetik asitten 1.5 ml ve %0.8 tiobarbitürik asit (TBA) solusyonundan 1.5 ml eklenerek karıştırıldı ve 95°C'de 60 dakika ısıtıldı. Soğutulduktan sonra 5 ml n-Butanol/Piridin (15/1 ;v/v) eklendi. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst tabakanın absorbansı 532 nm'de ölçüldü.

Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksiopropan kullanılarak hesaplanan MDA düzeyleri nmol/gram protein olarak ifade edildi.

#### 3.4.2.Doku Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD aktivitesi fotoredükte riboflavin ve oksijenin reaksiyonu ile oluşan süperoksitin, nitro bluetetrazolium'u redükte etmesinin SOD tarafından inhibe

edilmesi temeline dayanan, Fridovich ve Beuchamp'in yönteminin Winterbourn ve arkadaşları tarafından modifiye edilen şekliyle ölçüldü (79). Doku örneği 1/10 0.05 M KPO<sub>4</sub> tamponu pH 7.8 ile homojenize edildi. Doku protein içeriği Biüret metodu ile ölçüldü. 0.05 ml homojenat üzerine 100 ml' sinde 1.5 mg NaCN içeren 0.1 M EDTA'dan 0.2 ml, 1.5 mM NBT'den 0.1 ml eklendi. Tüplerin toplam hacimleri fosfat tamponu ile 3 ml'ye tamamlanarak sıcaklıkları 20-22°C'ye getirildi. Bütün tüplere 0.05ml 0.12 mM riboflavin eklendi ve 60x15x20 cm boyutlarında ve 15W bir floresanla üniform aydınlatılan lüminasyon kutusuna konuldu. 15 dakika bekletildikten sonra homojenat konmayan tüp kör olarak kullanılarak, 560 nm'de absorbanları ölçüldü. SOD standardının verdiği inhibisyon grafiğine işlenerek örneklerin SOD aktivitesi bulundu.

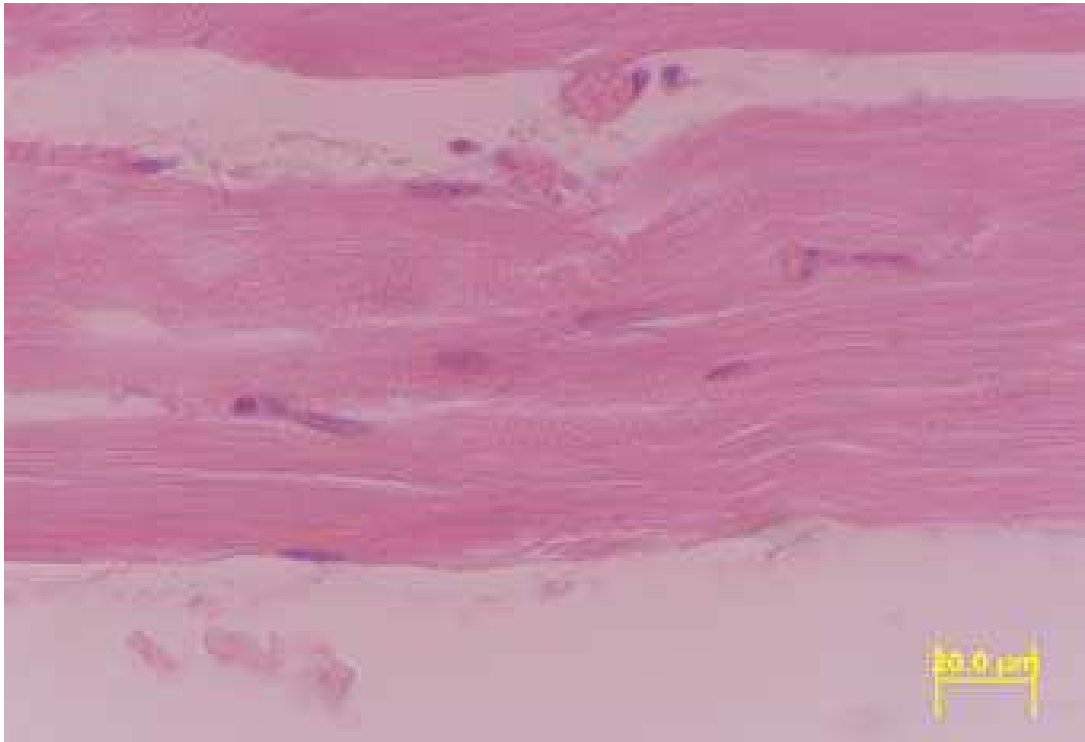
Bir SOD ünitesi NBT redüksiyonun maksimum inhibisyonunun yarısını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanarak enzim aktivitesi dokularda Ü/mg protein olarak verildi.



## 4.BULGULAR

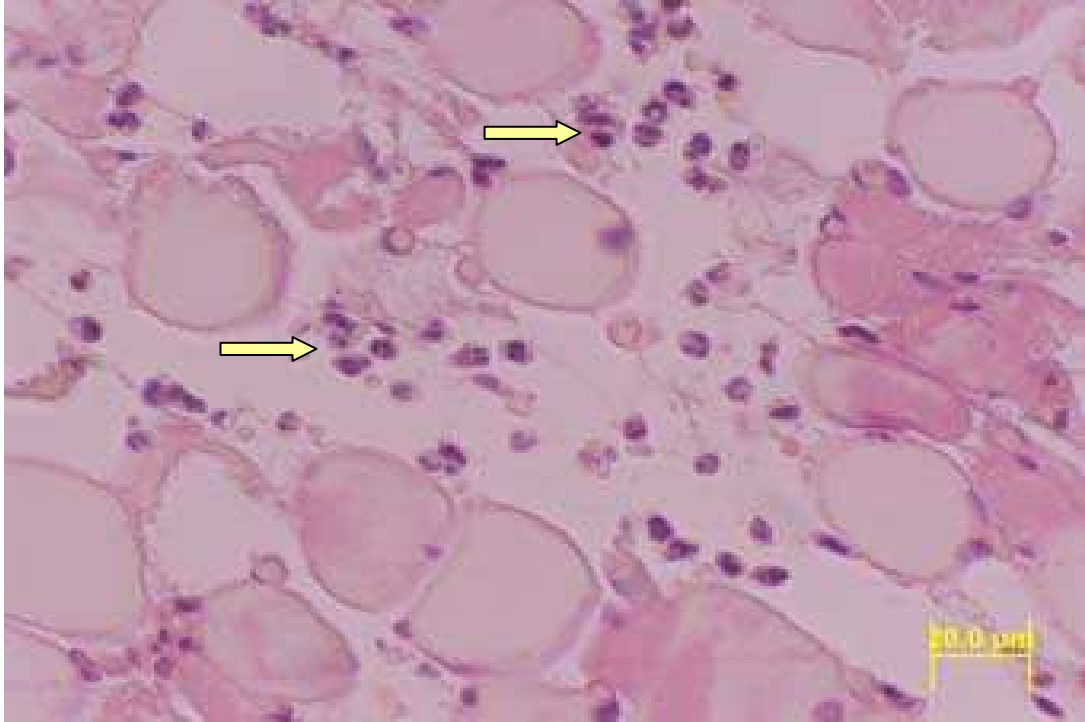
### 4.1.Histolojik İnceleme

Hematoksilin-eosin boyası ile boyanmış K grubuna ait kesitlerde kas liflerinin gruplar halinde enine belirgin çizgilenmeler oluşturduğu ve yassı şekilli nukleuslarının sarkolemmanın hemen altında yer aldığı gözlenmiştir (**Şekil 4.1**).

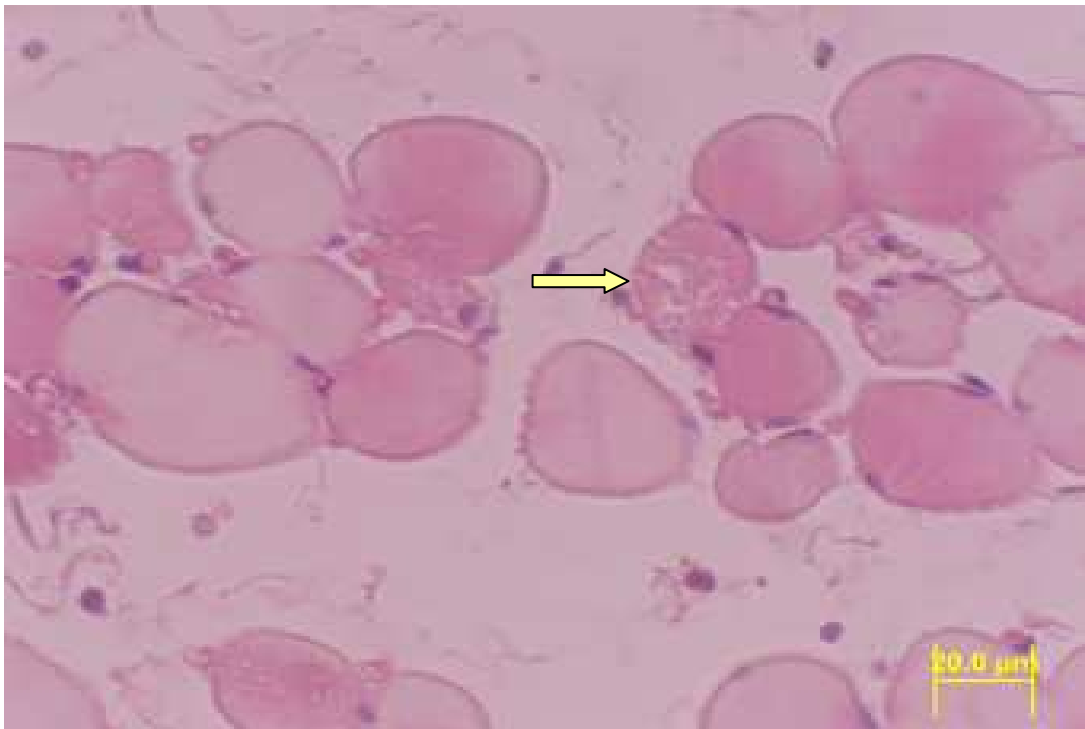


**Şekil 4.1** : K grubuna ait kesitte grup halinde kas lifleri.H&E. Bar 20  $\mu$ m

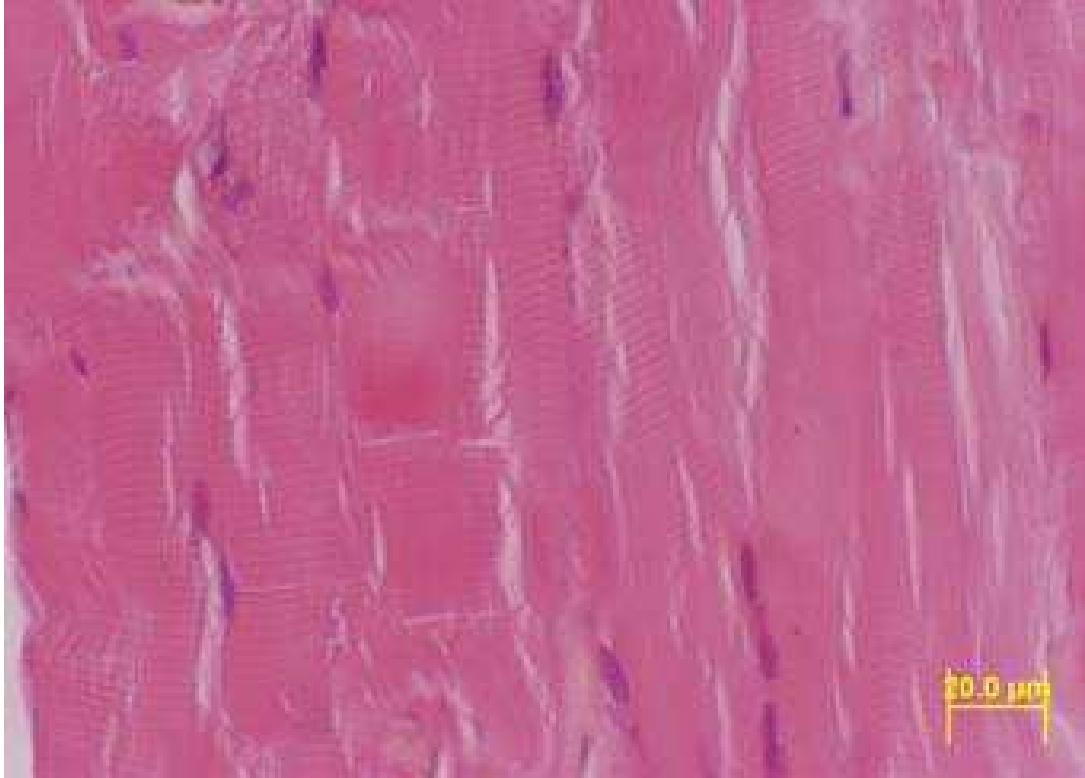
İ/R grubuna ait kesitlerde K grubundan farklı olarak kas lifleri arasında ve çevrelerinde nötrofil infiltrasyonu gözlenmiştir (**Şekil 4.2**). Ayrıca İ/R grubunda bazı kas liflerinde iç organizasyonun bozulduğu dikkati çekmektedir (**Şekil 4.3**). İ/R ve Quercetin'in birlikte uygulandığı gruplara ait kesitlerde ise K grubuna benzer histolojik yapı gözlenmiştir (**Şekil 4.4**).



**Şekil 4.2** : İ/R grubuna ait kesitte kas lifleri arasında (→) nötrofil infiltrasyonu (PNL) yaygın olarak gözleniyor.H&E. Bar 20 µm

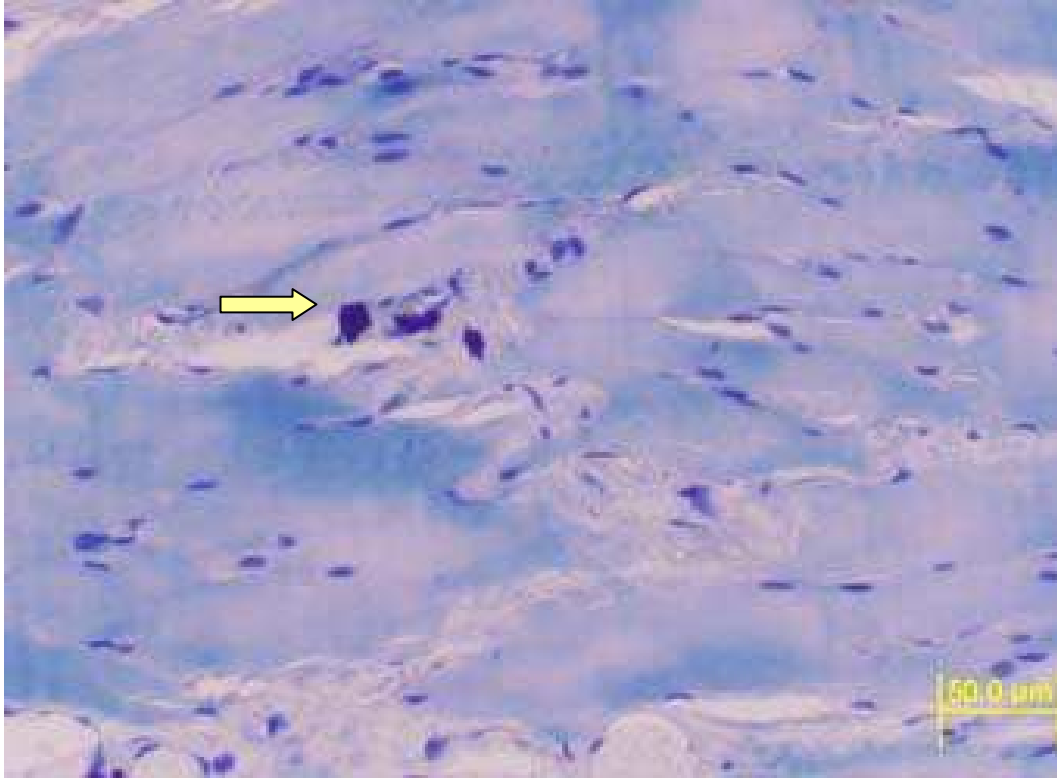


**Şekil 4.3** : İ/R grubuna ait kesitte bazı kas liflerinde (→) iç organizasyon bozulmuş olarak gözleniyor.H&E. Bar 20 µm



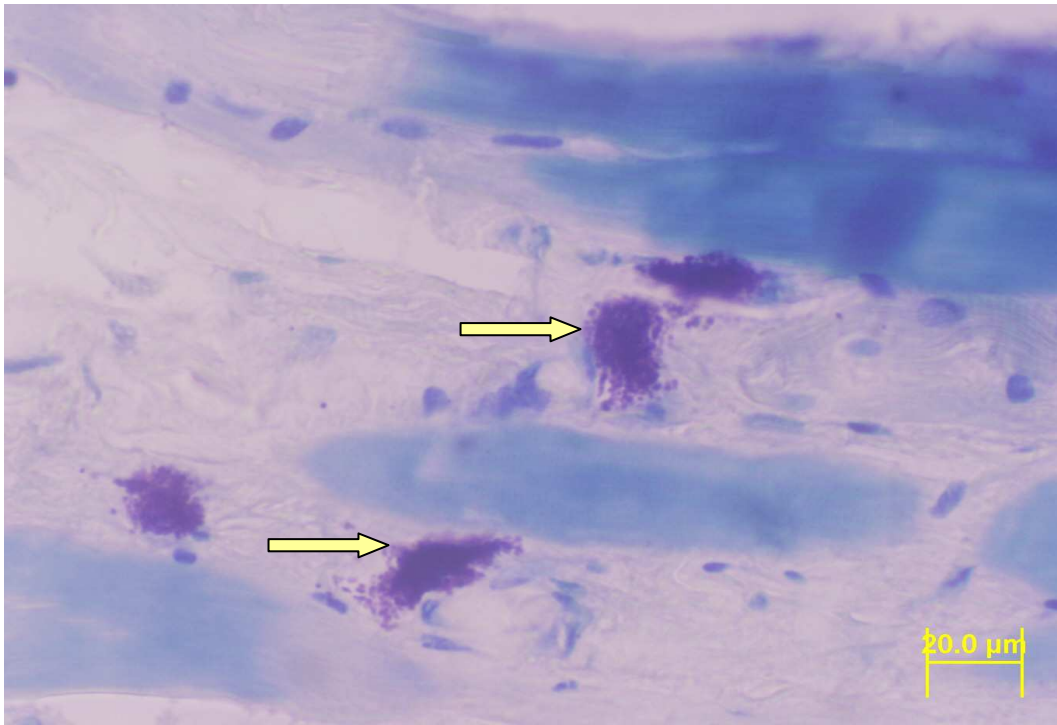
**Şekil 4.4 :** İ/R+Q grubuna ait kesitte gruplar halinde enine çizgilenme gösteren kas lifleri. H&E. Bar 20 μm

Mast hücrelerini incelemek için toluidine mavisi ile boyanmış kesitlerde K grubuna ve deney gruplarına ait mast hücreleri, degranüle ve granüle olarak sayılmışlardır. K grubuna ait kesitlerde granüle mast hücrelerinin sayıca fazla olduğu (**Şekil 4.6**), İ/R grubunda degranüle mast hücrelerinin sayılarının arttığı (**Şekil 4.7**), İ/R+Q grubuna ait kesitlerde ise K grubuna benzer şekilde granüle mast hücrelerinin daha fazla sayıda olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4.8**). Ayrıca İ/R grubunda histolojik görünüm olarak degranülasyonun çok şiddetli gerçekleştiği ancak İ/R+Q grubunda degranülasyonun normal şiddette olduğu izlendi.



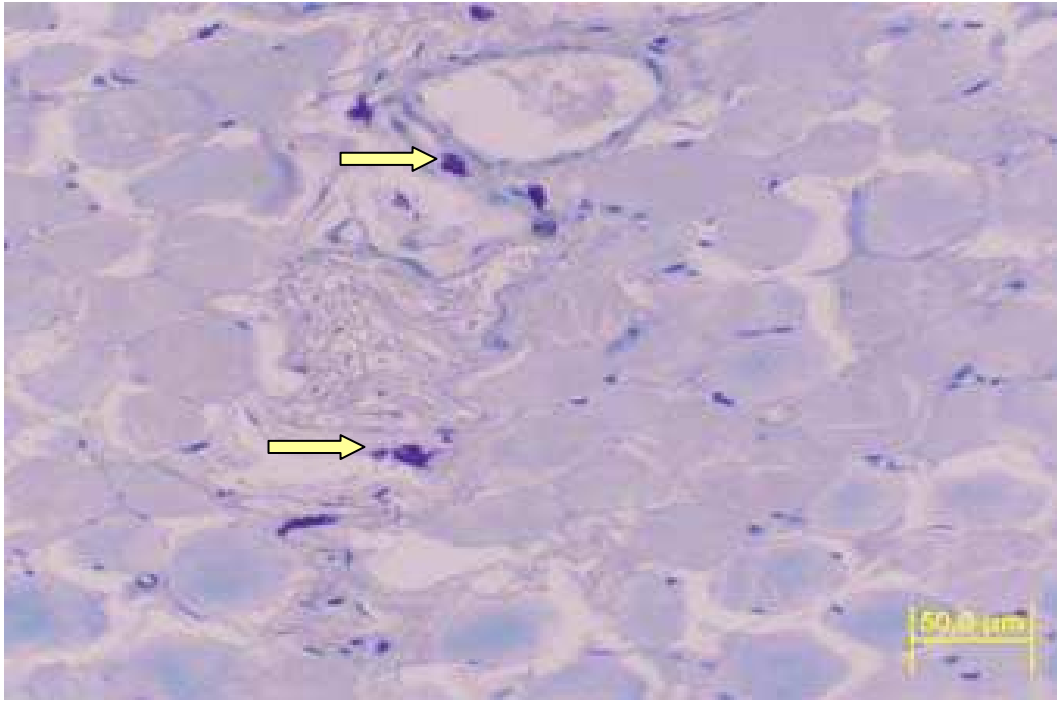
**Şekil 4.5 :** K grubuna ait kesitte (→) granüle mast hücreleri.

Toluidine mavisi. Bar 50 µm



**Şekil 4.6 :** İ/R grubuna ait kesitte (→) degranüle mast hücreleri .

Toluidine mavisi. Bar 20 µm



**Şekil 4.7 :** İ/R + Q grubuna ait kesitte çoğunluğu (→) granüle mast hücreleri. Toluidine mavisi. Bar 50 µm



**Şekil 4.8 :** İ/R + Q grubuna ait kesitte (→) granüle mast hücreleri büyük büyütme ile gözleniyor. Toluidine mavisi. Bar 20 µm

## 4.2.Biyokimyasal Sonuçlar

### 4.2.1.MDA Sonuçları

Biyokimyasal inceleme sunucunda İ/R grubunda yüksek MDA düzeyleri bulunmuştur. K ve İ/R+Q grubunda sonuçlar birbirlerine benzer şekilde düşük düzeydeydi. Her bir dokudan elde edilen MDA düzeyleri gruplara ayrılarak tablo 4.1 de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1** : Doku MDA Düzeyleri.

MDA DÜZEYİ (nmol/gr protein)		
KONTROL	İSKEMİ/REPERFÜZYON (I/R)	İSKEMİ/REPERFÜZYON (I/R) + QUERCETİN
28,33	38,33	25,15
20,27	48,83	44,39
38,40	47,91	29,16
19,65	47,51	27,22
26,60	48,33	38,78
36,04	46,92	31,15
37,27	43,75	30,60

### 4.2.2.SOD Düzeyleri

SOD enziminin düzeyleri İ/R grubunda azalmış olduğu tesbit edildi. K ve İ/R+Q gruplarında ise benzer şekilde yüksek değerler elde edildi. SOD enziminin her bir dokuda elde edilen sonuçlar tablo 4.2 de gruplar halinde gösterilmiştir.

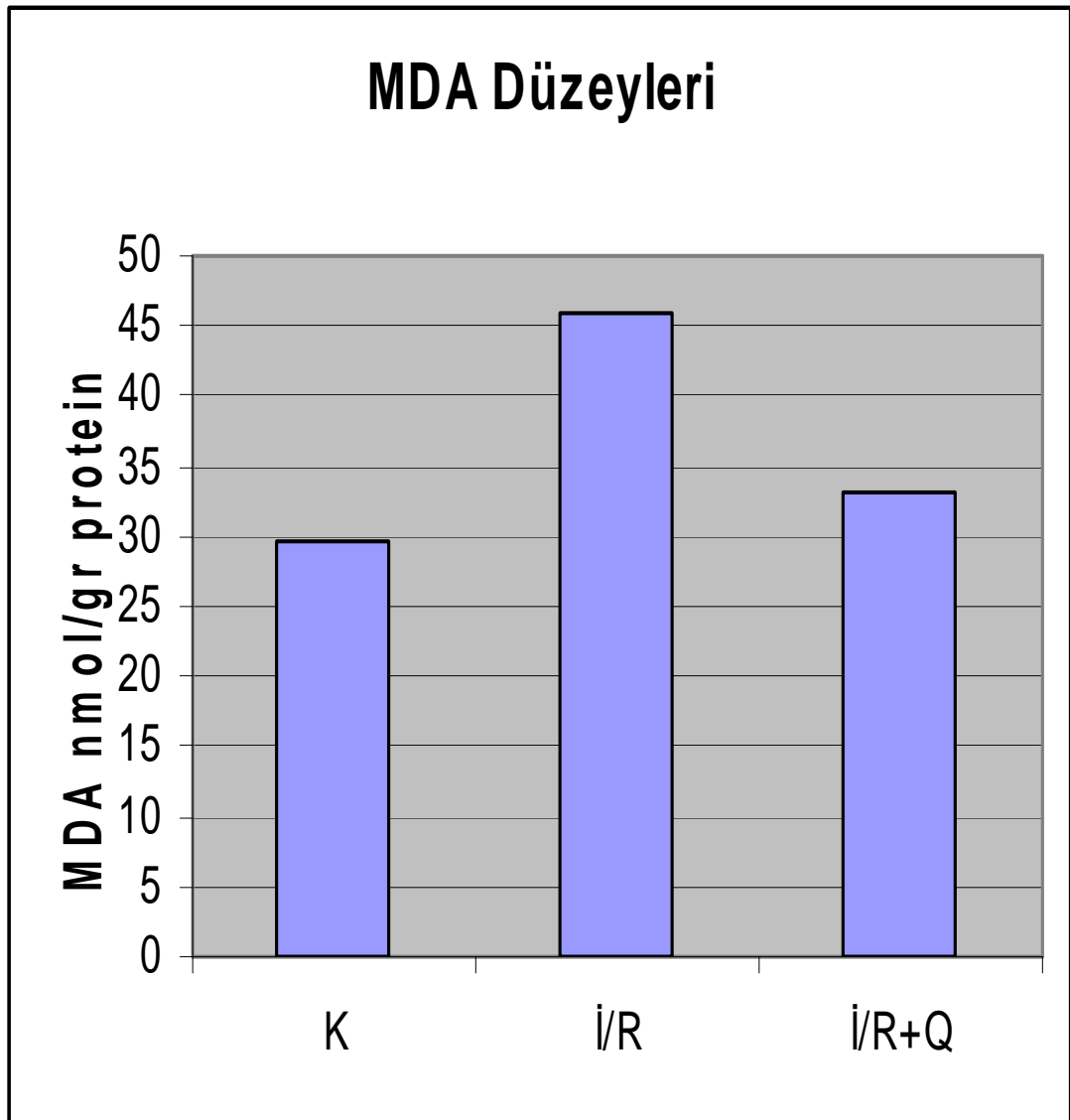
**Tablo 4.2** : Doku SOD Aktivitesi Düzeyleri.

SOD AKTİVİTESİ (Ü/mg protein)		
KONTROL	İSKEMİ/REPERFÜZYON (I/R)	İSKEMİ/REPERFÜZYON (I/R) + QUERCETİN
28,80	10,80	29,20
34,00	11,00	20,60
13,50	11,00	20,10
16,80	14,70	14,20
23,90	15,60	17,50
31,30	17,70	19,50
20,00	11,70	26,70

### 4.3.İstatistik Sonuçları

#### 4.3.1. MDA Düzeyleri

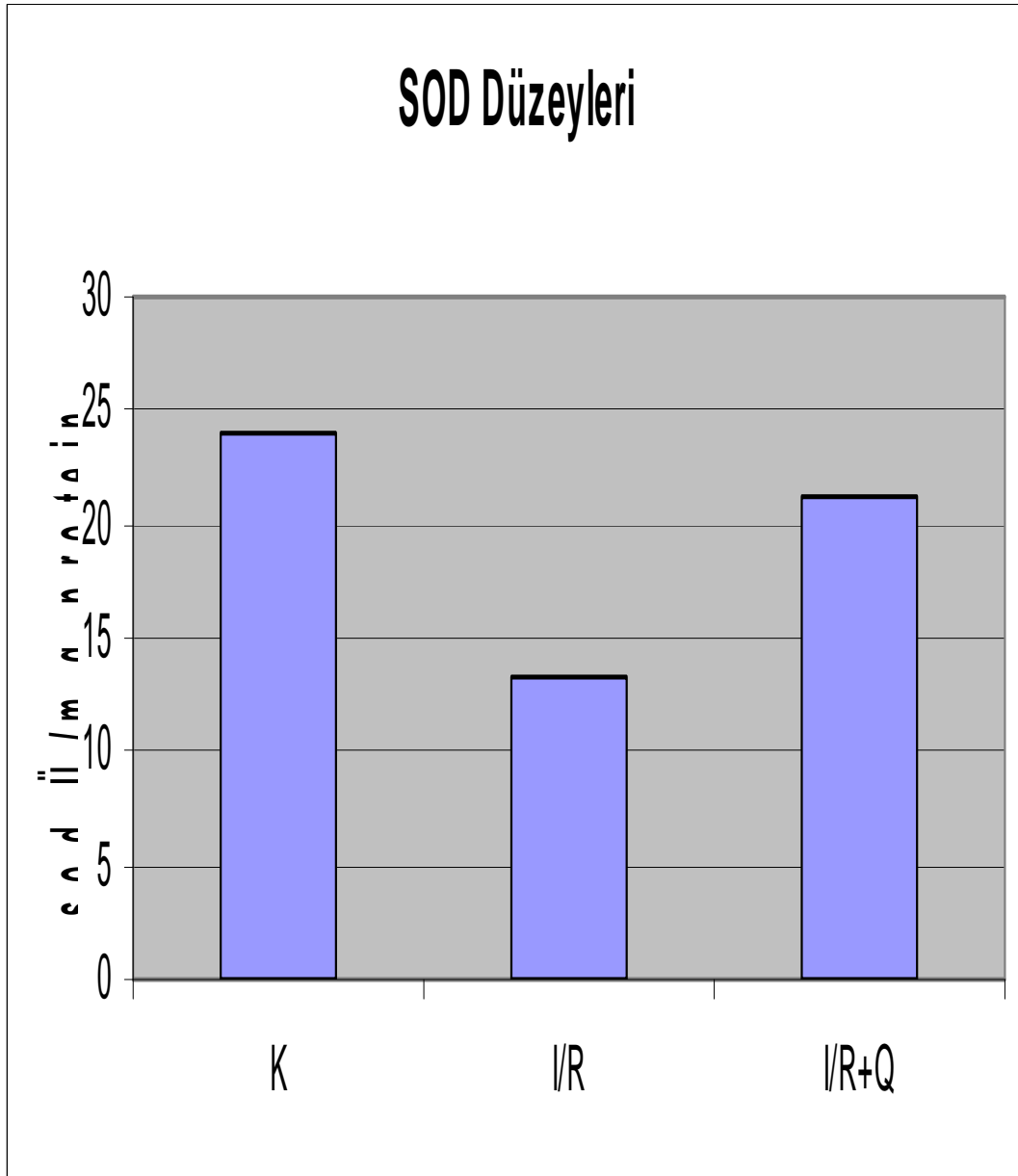
İ/R grubu ile K ve Quercetin verilen İ/R+Q grubu arasında önemli düzeyde farklılık vardı ( $F_{2;18} = 12.53$ ,  $P < 0.001$ ). K grubu ile İ/R+Q grubu arasında anlamlı farklılık yoktu.



**Şekil 4.9** : Doku MDA düzeyleri (K: Kontrol, İ/R: İskemi /Reperfüzyon, İ/R+Q: İskemi Reperfüzyon+Quercetin).

### 4.3.2.SOD Düzeyleri

İ/R grubu ile K ve İ/R+Q grubu arasında önemli düzeyde farklılık bulunmuştur ( $F_{2;18} = 7.04$ ,  $P < 0.01$ ). K grubu ile Quercetin verilen İ/R+Q grubu arasında anlamlı farklılık yoktu.



**Şekil 4.10** : Doku SOD düzeyleri (K: Kontrol, İ/R: İskemi /Reperfüzyon, İ/R+Q: İskemi /Reperfüzyon+Quercetin).



### 4.3.3.Nötrofil Hücresi

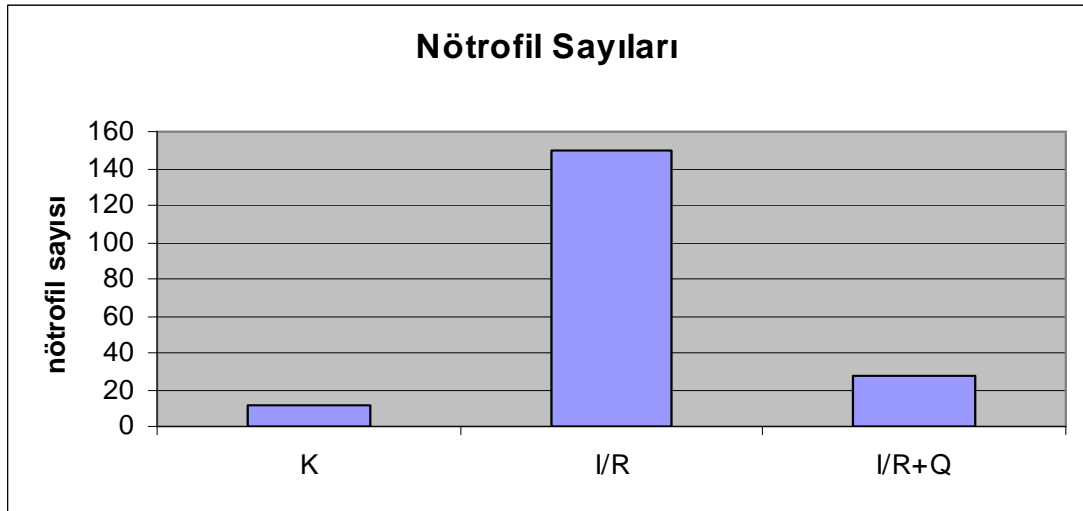
Dokularda yapılan nötrofil sayımının istatistiksel analizinde İ/R grubu ile kontrol ve İ/R+Q grupları arasında önemli düzeyde farklılık bulundu ( $\chi^2 = 14.28$ ,  $P < 0.01$ ). Kontrol ve İ/R+Q grupları arasında fark yoktu.

**Tablo 4.3** : Doku Nötrofil Sayıları.

DOKU NÖTROFİL SAYISI		
KONTROL	İSKEMİ/REPERFÜZYON (I/R)	İSKEMİ/REPERFÜZYON (I/R) + QUERCETİN
11	150	36
31	225	29
8	133	17
11	258	33
27	108	28
9	169	6
23	96	27

**Tablo 4.4** : Nötrofil Hücre Karşılaştırılması.

GRUPLAR	SAYI (n)	MEDYAN DEĞERLER
KONTROL	7	11
I/R	7	150
I/R+ Q	7	28



**Şekil 4.11** : Doku nötrofil sayıları (K: Kontrol, I/R: İskemi /Reperfüzyon, I/R+Q: İskemi /Reperfüzyon+Quercetin).

#### 4.3.4.Mast Hücreleri

Mast hücrelerinin granüle ve degranüle şekilleri ayrı ayrı sayılarak iki grup oluşturuldu ve istatistiksel olarak analiz edildi.

**Tablo 4.5** : Doku Mast Hücre Sayısı.

MAST HÜCRE SAYISI					
KONTROL		İSKEMİ/REPERFÜZYON (I/R)		İSKEMİ/REPERFÜZYON (I/R) + QUERCETİN	
GRANÜL E	DEGRANÜLE	GRANÜLE	DEGRANÜLE	GRANÜL E	DEGRANÜLE
25	31	11	43	6	33
20	37	14	50	17	36
43	16	15	65	14	38
14	27	11	46	13	25
38	41	28	38	23	24
34	23	5	68	16	25
33	43	3	49	9	20

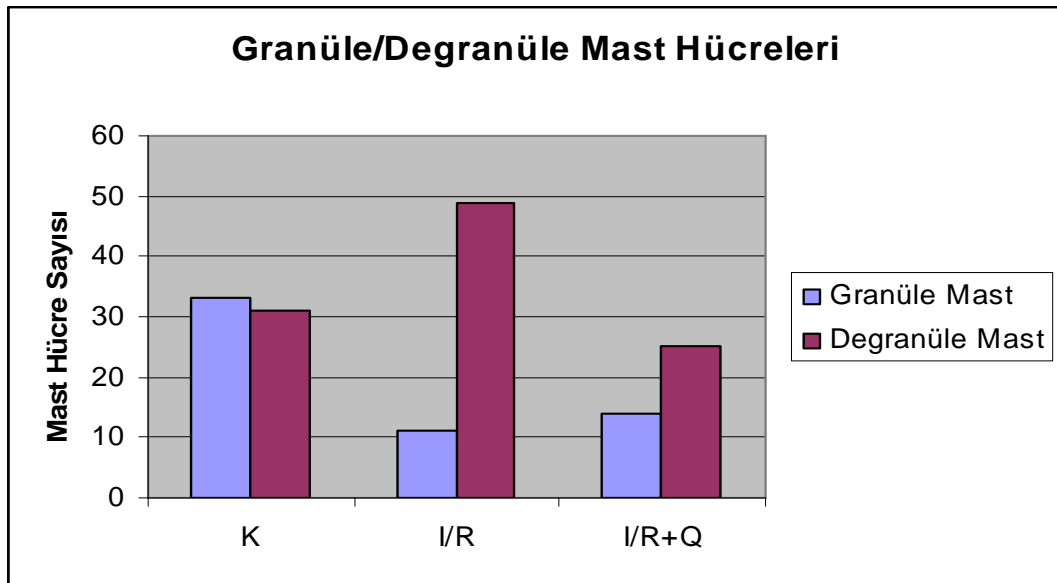
Granüllerini koruyan mast hücrelerinde kontrol grubu ile İ/R ve İ/R+Q grupları arasında önemli düzeyde fark vardı ( $\chi^2 = 9.20$ ,  $P < 0.05$ ). İ/R ve İ/R+Q grupları arasında ise fark bulunamadı.

Degranüle olan mast hücrelerinde İ/R grubu ile kontrol ve İ/R+Q grupları arasında önemli düzeyde fark bulunurken ( $\chi^2 = 12.03$ ,  $P < 0.01$ ), kontrol grubu ile İ/R+Q grubu arasında önemli fark yoktu.

Granüle ve degranüle mast hücreleri her grupta kendi içinde karşılaştırıldığında ise kontrol grubunda granüle ve degranüle mast hücreleri arasında önemli düzeyde farklılık yoktu ( $z = -0.51$ ,  $P > 0.05$ ). İ/R grubunda granüle ve degranüle mast hücreleri arasında degranülasyon lehine önemli düzeyde fark bulundu ( $z = -2.37$ ,  $P < 0.05$ ). İ/R+Q grubunda granüle ve degranüle mast hücreleri arasında degranülasyon lehine önemli düzeyde fark vardı ( $z = -2.37$ ,  $P < 0.05$ ).

**Tablo 4.6** : Mast Hücresi Granüle / Degranüle Karşılaştırılması.

GRUPLAR	SAYI (n)	GRANÜLE MEDYAN	DEGRANÜLE MEDYAN
KONTROL	7	33	31
İ/R	7	11	49
İ/R+ Q	7	14	25



**Şekil 4.12** : Doku mast hücreleri granüle/degranüle karşılaştırılması (K: Kontrol, I/R: İskemi /Reperfüzyon, I/R+Q : İskemi /Reperfüzyon+Quercetin).

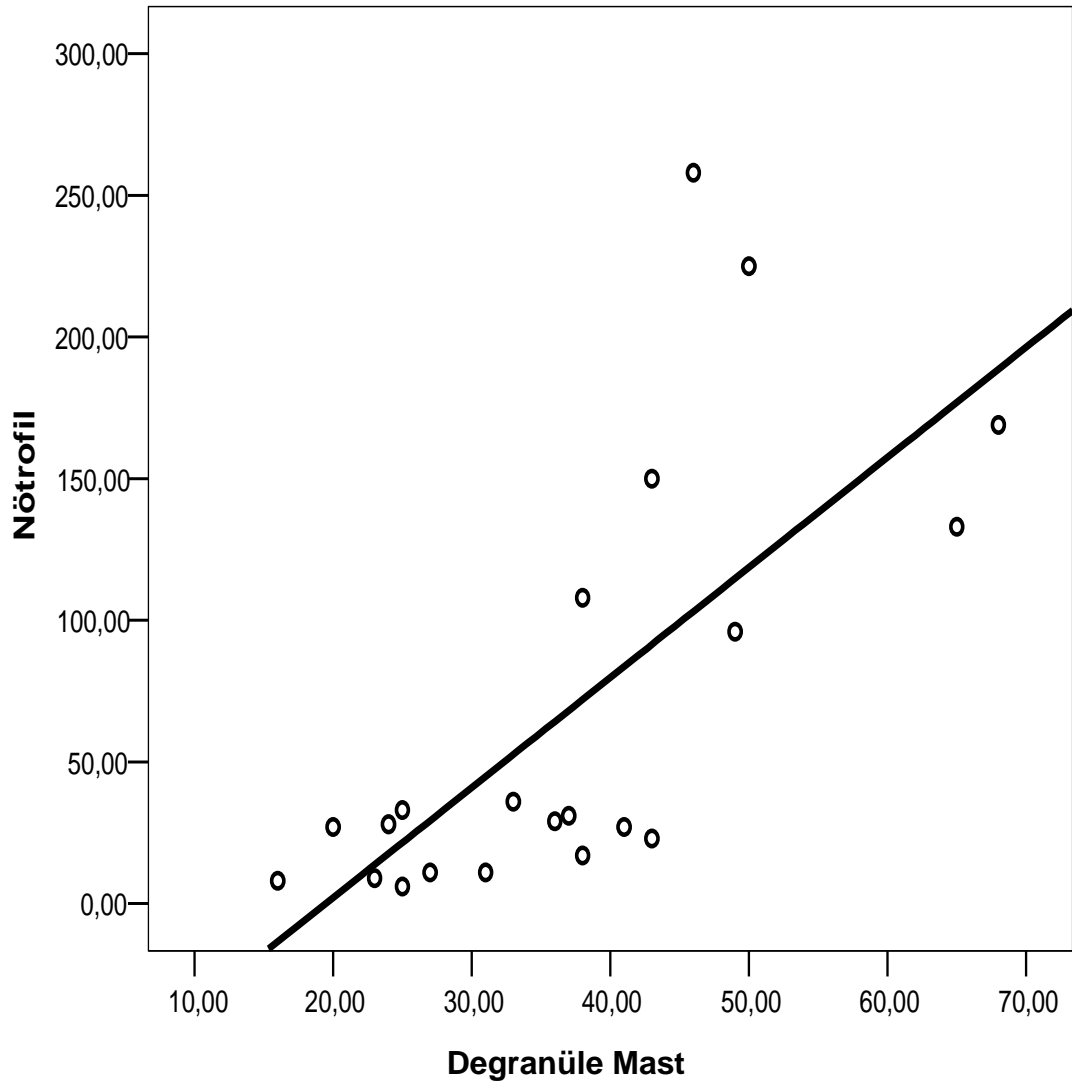
Mast hücrelerinin granüle ve degranüle şekillerinin her grupta sayıca birbirlerine oranlanması sonucunda I/R grubu ile K grubu ve I/R+Q grubu arasında önemli düzeyde fark bulundu ( $F_{2;16} = 8.64$ ,  $P < 0.01$ ). K grubu ile I/R+Q grupları arasında önemli düzeyde fark bulunmadı.

**Tablo 4.7** : Mast Hücresi Granüle / Degranüle Oranlaması.

GRUPLAR	SAYI (n)	ORTALAMA DEĞER	STANDART SAPMA
KONTROL	5	1,02	0,09
I/R	7	0,49	0,06
I/R+ Q	7	0,81	0,11

#### 4.3.5.Mast / Nötrofil Hücre Sayılarının Karşılaştırılması

Mast hücreleri toplam sayısı ile nötrofil hücrelerinin sayılarının arasında korelasyon araştırıldığında kontrol grubunda ( $r= 0.26$ ,  $P>0.05$ ), İ/R grubunda ( $r= 0.54$ ,  $P>0.05$ ), İ/R+Q grubunda ( $r= -0.18$ ,  $P>0.05$ ) önemli derecede ilişki bulunamadı. Ancak degranüle olmuş mast hücreleri sayısı ile nötrofil sayısı karşılaştırıldığında ileri derecede önemli ilişki bulundu ( $r= 0.74$ ,  $P<0.001$ ).



**Şekil 4.13** : Degranüle olmuş mast hücre sayısı ile nötrofil sayısı arasındaki ilişki.

## 5.TARTIŞMA

İskemide morfolojik ve fonksiyonel olarak kası da içeren pek çok dokuda mikrovasküler düzeyde değişiklikler meydana gelir. Reperfüzyon sırasında, kan elemanları ve iskemik doku arasındaki etkileşimler sonucunda hasarlar artar (1). İ/R hasarının önlenmesi için pek çok çalışma yapılmıştır. Serbest oksijen radikallerinin üretiminin ksantin oksidaz inhibisyonu yapan allopurinol ile önlenmesi, radikallerin ortamdaki temizlenmesi için vitamin E, C, süperoksit dismutaz, resveratrol, karvedilol, Quercetin ve koenzim Q kullanılması ile İ/R hasarı azaltılabilmektedir (60,61,80- 83).

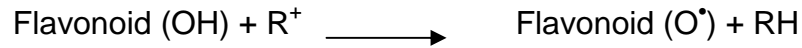
İskemi sonrası dokularda inflamatuvar hücrelerin, özellikle nötrofil ve mast hücrelerinin reperfüzyon hasarında sorumlu olduklarının bulunması ile bu hücrelerin doku infiltrasyon ve aktivasyonlarının engellenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmış ve doku hasarı azaltılabilmektedir (2, 3, 34, 15, 50, 84, 85).

Serbest radikallerin etki mekanizmaları tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte en önemli etkilerinden biri lipid peroksidasyonu yoluyla hücre membranının hasarı olarak görünmektedir. Serbest radikaller ayrıca yaygın yangısal hasar oluşturabilirler ve doku hasarına yardım eden çeşitli yangısal mediatörleri çekebilirler (8, 15, 86).

Varolan tedavilerin her biri spesifik olayları inhibe ettiği için, aynı tedavide farklı hedeflere yönelerek birden fazla basamağı etkileyen tedavi stratejisine gereksinim vardır (4). Bir flavonoid olan Quercetin hücrede biyolojik etkilerini iyi araştırılmıştır ve İ/R hasarının pek çok basamağında etkisi olması muhtemeldir (8, 15).

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin etkisi sonucu membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olup bir radikalın yağ asidi zincirindeki  $\alpha$ -metilen gruplarından bir hidrojen atomunun ( $H^+$ ) uzaklaştırılması ile başlar. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehittir (63). Lipid peroksidasyonunun başlamasında asıl etkili olan radikal  $OH^{\bullet}$  radikali olduğu kabul edilmektedir (63,64). Quercetin serbest radikale bağlı hasardan korunmayı farklı yollara yapmaktadır. Bu yollardan biri direkt radikal temizleme özelliğidir. Quercetin  $OH^{\bullet}$  radikalini (8,11,15,74,75) ve onun

prekürsörü olan  $O_2^{\bullet-}$  radikalini (8,15,74) temizlemesinin yanında önemli bir özelliği de, lipid peroksil radikalini parçalayarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır (8, 77). Radikallerin flavonoidler ile aşağıdaki reaksiyonla oksidize edilmeleri onları daha stabil hale getirir ve reaktivitelerini düşürür (8, 15):



Quercetin ayrıca Fe ve Cu gibi geçiş metallerini şelatlayarak bu iyonların Fenton reaksiyonu yolu ile  $H_2O_2$ 'den  $OH^\bullet$  radikali oluşumunu engelleyerek lipid peroksidasyonunu önlemektedir (10,12,14,15,75). Flavonoidlerin lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve MDA düzeylerini anlamlı olarak düşürdükleri gösterilmiştir (8, 10, 12, 13, 15).

Yapılan literatür araştırmasında iskelet kasında iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde Quercetin'in etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahi pratiğinde sık kullanılan kas fleplerinin İ/R hasarını, serbest doku aktarımı modeli olarak latissimus dorsi kas flebi üzerinde antioksidan Quercetin maddesini kullanarak araştırıldı. Çalışmada iskemiden önce Quercetin uygulanan grupta (İ/R + Q) kas dokusunda MDA düzeyleri, verilmeyen gruba (İ/R) göre anlamlı olarak azalmıştır (  $P < 0.001$  ). K grubu ile İ/R + Q grubu arasında anlamlı fark yoktur. Bu sonuç Quercetin'in kas hücresi membranlarını lipid peroksidasyonundan belli oranda koruduğunu göstermiştir. Bulgu literatür ile uyum göstermiştir.

SOD, oksijeni metabolize eden hücreleri,  $O_2^{\bullet-}$  radikalinin zararlı etkilerine karşı koruyan ve yaşam için varlığı gerekli olan bir enzimdir (5).

Çalışmada Quercetin verilen grubun (İ/R + Q) SOD düzeyleri, verilmeyen gruba (İ/R) göre anlamlı olarak artmıştır. (  $P < 0.05$  ). Kontrol grubu ile İ/R + Q grubu arasında anlamlı fark yoktur. İ/R grubunda SOD aktivitesinin azalması serbest radikallerle ilişkili olabilir. Çünkü proteinler serbest radikallerden etkilenirler ve bu etkilenmenin derecesi aminoasit içeriklerine bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle

etkileşimleri yüksek olduğundan histidin, metionin gibi aminoasitlere sahip proteinler radikallerden kolaylıkla etkilenirler (5). SOD enziminin katalitik bölgesinde histidin aminoasiti vardır. Kahraman ve arkadaşları, UV radyasyonla indüklenen oksidatif hasarda (14) ve böbrek dokusu iskemi reperfüzyon hasarında (12) Quercetin'in  $O_2^{\cdot-}$  radikallerini yakalayarak SOD aktivitesindeki azalmayı önleyebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da antioksidan Quercetin ile SOD düzeylerini yüksek bulduk. Bu bulgu literatürle uyumlu olup hem SOD enziminin radikal kaynaklı hasardan korunması hem de enzimin tüketilmesinin önlenmesi nedeniyle olabilir.

Normal şartlarda lökositler damar içinde serbestçe hareket ederler. İskemi ve yangı sırasında endotel kaynaklı mediatörler ile lökosit –endotel ilişkisi sonucunda lökositler adhezyon sonucu immobilize olurlar ve dokuya migrasyonla infiltre olup toksik ürünler ile doku hasarına neden olurlar. Lökositlerin adhezyonlarının değişik basamaklarda engellenmesi ile İ/R hasarının önlendiği değişik araştırmalarda gösterilmiştir (2,12,29,30,32,34). Köse ve arkadaşları (50) lökosit adhezyonunda ilk basamak olan rolling fazını fucoidin ile doza bağımlı olarak inhibe ederek ratlarda oluşturulan cilt flebinde İ/R hasarını azaltmışlardır. Quercetin'in reperfüzyon sırasında endotele yapışan olan lökosit sayısını azalttığı ve toksik lizozomal ürünlerin degranülasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (8,15).

Quercetin'in lökosit kaynaklı hasarı önleme mekanizmaları fosfolipaz  $A_2$  inhibisyonu ile siklooksijenaz ve lipooksijenaz oluşumunun önlenmesi, lökosit NADP oksidazı inhibe etmesi, miyeloperoksidazı inhibe etmesi, süperoksit üretimini inhibe etmesidir (15).

Flavonoidler adhezyon moleküllerinin oluşumunu da engellemektedir (15). Adhezyon molekülleri inflamasyonda dolaşan lökositler ve endoteller tarafından eksprese edilirler. Endotel hücrelerinden çeşitli sitokinler (İL-1, TNF- $\alpha$ , gamma interferon gibi) etkisiyle intersellüler adhezyon molekülü-1 (İCAM-1) ortaya çıkmaktadır. Quercetin'in umblikal ven endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada İCAM-1 gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (15). Ayrıca kültüre insan endotel hücrelerindedeki aynı sonuç elde edilmiştir (87). Bu etki lökosit adhezyonunu azaltarak İ/R hasarısını engellemeye yardımcı olabilir.



Bu çalışmada dokularda yapılan nötrofil sayımının istatistiksel analizinde İ/R grubu ile K ve İ/R+Q grupları arasında önemli düzeyde farklılık bulundu ( $P<0.01$ ). Kontrol ve İ/R+Q grupları arasında fark yoktu. Histolojik ve istatistiksel olarak Quercetin dokuya nötrofil göçünü önlediği ortaya konuldu. Bu bulgu genel olarak Quercetin güçlü antiinflamatuvar etki gösterdiğinin kanıtıdır. İnflamasyonun doku hasarını başlatma ve sürdürme etkisi düşünüldüğünde bu bulgunun önemi anlaşılabilir.

Quercetin, İ/R sırasında serbest radikallerin major kaynaklarından olan ksantin oksidaz enziminin aktivitesini inhibe etmektedir. Böylece oksidatif hasarda azalma sağlamaktadır (8, 15).

Quercetin membran fosfolipidlerinden kaynaklanan araşidonik asit metabolitlerinin oluşumunu da inhibe etmektedir (8, 15). Bu metabolitler pek çok fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynamaktadır. Araşidonik asit salınması yaygın yangısal yanıt için başlangıç noktasıdır. Lökotrienler düz kas kontraksiyonu, vazoaaktif etkiler, kemoatraktan etkiler yapmaktadır. Siklooksijenaz ürünlerin inhibisyonu ile platelet agregasyonu önlenmektedir (8,15). Bu metabolitler serbest radikal oluşurabilmektedir (53). Bu nedenle Fosfolipaz A<sub>2</sub> inhibisyonu ile yangının şiddeti azalmaktadır.

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (İNOS) enzimi tarafından arjininden sentezlenen NO damar dilatasyonun sürdürülmesini sağlar. Quercetin endotel ve makrofajlarda NO oluşumunu önleyerek İ/R hasarını azaltırlar. Çünkü NO ile serbest radikallerin reaksiyonları peroksinitrit oluşturarak hücre membran hasarı yaparlar. Quercetin serbest radikalleri yakalayarak NO ile daha kısa süre reaksiyona girmelerini sağlar (8, 15).

Mast hücreleri akut ve kronik pek çok yangısal ve alerjik olayda merkezi rolü olan hücrelerdir. Dokudaki etkilerini granüllerinde bulunan kimyasal maddeler ile yaparlar. Mast hücre granülleri başta heparin ve histamin olmak üzere triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, ve nötral proteazları gibi çeşitli mediyatörleri içerirler. Proteazlar dört sınıfa ayrılırlar. Bunlar; serin proteazlar, metalloproteazlar, aspartik proteazlar ve sistein proteazlardır. Çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlarda; mast hücrelerinin granüllerinin içeriğini hücre dışına boşalttıkları bilinmektedir. Bu hücreler; iskemi-

reperfüzyon hasarı, inflamasyon ve hipersensitivite reaksiyonlarında degranüle olarak fonksiyon yaparlar (3, 7). İ/R hasarında hangi mediyatörün daha etkili olduğu açık değildir. Quercetin mast hücrelerinin degranülasyonunu plazma membranında bulunan reseptör ilişkili  $Ca^{2+}$  kanallarını modüle ederek inhibe eder (8, 15).  $Ca^{2+}$  bağımlı ATPaz inhibisyonu ile mast hücre degranülasyonu da inhibe olmaktadır. Ayrıca İ/R durumlarında serbest radikallerin lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu yaparak mast hücrelerinin stoplazmik ve granül membranlarının hasarlanması ile de mast hücre ürünlerinin ortama salınması söz konusu olabilir. Ratlarda yapılan bir çalışmada Quercetin peritoneal mast hücrelerinden histamin salınmasını önlemiştir (15).

Bortolotto ve arkadaşları (3) iskelet kası İ/R hasarında mast hücrelerinin rolünü gösteren çalışma yaptılar. Mast hücreleri yok edilmiş fareler ile mast hücreleri bulunan fareler ve normal farelerin kemik iliği mast hücre öncüllerinin költürlere edilerek verildikleri üçüncü bir mast hücreleri yok edilmiş fare grubunda uyguladıkları 70 dakika iskemiye takiben 24 saatlik reperfüzyon sonrası 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 ve 24 saatlerde ve 3.gün geç reperfüzyon döneminde gastroknemius, ekstansör digitorum longus ve soleus kaslarında patolojik incelemeler yaparak karşı kas grupları ile karşılaştırdılar. Reperfüzyonun 1.saatinde mast hücre sayısı belirgin olarak azaldığını (%85), bu durumun mast hücre degranülasyonuna bağlı olabileceğini ve yavaşca yükselerek 24.saatte bazal sayılarına ulaştığını, bu artışın komşu konnektif dokudan göç ile olabileceğini düşündüler. Bu çalışmada mast hücreleri yok edilmiş farelere kemik iliği költüre mast hücresi verilerek restorasyon yapıldığında kastaki İ/R hasarının normal farelerle aynı şekilde olduğu tesbit edilmiş olup, mast hücresi bulunmayan grupta kas canlılığının belirgin olarak devam ettiği, dolayısı ile İ/R hasarına olan direncin arttığını buldular. İ/R esnasında hangi mekanizma ile degranülasyonun gerçekleştiği açık olmamasına karşın daha önce İ/R hasarında rolü olduğu gösterilen membran atak kompleksinin (kompleman 5-9) tetiklediği düşünülmektedir (3). Bu görüşe alternatif olarak mast hücreleri iskemi

sürecinde subletal hasarlanarak oto degranülasyonuna uğradığı düşünülebilir.

Alerji ve astım gibi patolojik hastalıklarda mast hücre katılımı ve miktarlarının arttığı bilinmektedir. Bu hücrelerin iskelet kası İ/R hasarındaki rollerinin ortaya konması kilit bulgudur ancak bugüne kadar hasarı önlemek için bu yönde terapötik yaklaşımla ilgili çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmanın sonucunda mast hücreleri sayılarının ortalaması gruplar arasında birbirine yakın olarak saptandı. K grubuna göre (ortalama 57), İ/R grubunda hafif artmış (ortalama 64), İ/R+Q grubunda hafif azalmış (ortalama 41) bulundu. Ancak mast hücrelerinin granüle ve degranüle şekilleri ayrı ayrı sayıldığında ve birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu. Mikroskopik olarak mast hücrelerinin İ/R grubunda degranülasyonunun sayıca daha fazla ve degranülasyonunun çok daha şiddetli olduğu görüldü. Granüllerini koruyan mast hücrelerinde kontrol grubu ile İ/R ve İ/R+Q grupları arasında önemli düzeyde fark vardı. İ/R ve İ/R+Q grupları arasında ise fark bulunamadı. Degranüle olan mast hücrelerinde İ/R grubu ile kontrol ve İ/R+Q grupları arasında önemli düzeyde fark bulunurken kontrol grubu ile İ/R+Q grubu arasında önemli fark yoktu. Quercetin mast hücrelerinin degranülasyonu bariz şekilde azalttığı tesbit edildi. Ayrıca her grup kendi içinde birbirlerine oranlandığında İ/R grubunda degranüle hücre sayısı lehine artış gözlemlendi. Kontrol ve İ/R+Q grupları arasında fark yoktu. Bu bulgu Quercetin dokü mast hücresi toplam popülasyonunda granüle degranüle oranının korunmasını sağladığını göstermektedir.

Mast hücrelerinin dokü içindeki sayıları genellikle sabit olup çeşitli durumlarda granüllerinde mevcut olan ve daha sonra yeni sentez yoluyla pek çok kimyasal maddeyi salgılayarak doküde yangı yapmaktadır. Özellikle triptaz salınması komşu mast hücrelerinden degranülasyonu uyarmakta ve yangı sahasına lökositleri de çekerek yangının şiddetlenmesine neden olmaktadır (36). Bu çalışmada nötrofiller ile mast hücreleri arasında korelasyon varlığı incelendi. Toplam mast hücre sayısı ile nötrofil sayısı arasında kontrol grubunda ( $r= 0.26, P>0.05$ ), İ/R grubunda ( $r= 0.54, P>0.05$ ), İ/R+Q grubunda ( $r= -0.18, P>0.05$ ) önemli derecede ilişki bulunamadı. Ancak

degranüle olan mast hücreleri sayısı ile nötrofil sayısı karşılaştırıldığında ileri derecede önemli ilişki bulundu ( $r= 0.74$ ,  $P<0.001$ ). Bu bulgu literatür ile uyumlu olup mast nötrofil etkileşiminin hasarlı dokuda nötrofil sayısının artmasına ve kısır döngü içine girilerek doku hasarının şiddetlenmesine neden olduğunu göstermektedir. Quercetin mast hücre degranülasyonunu anlamlı şekilde azaltmıştır. Ayrıca histolojik olarak, Quercetin degranülasyonun şiddetini azaltmıştır. Degranüle olan mast hücrelerinde İ/R grubu ile kontrol ve İ/R+Q grupları arasında önemli düzeyde fark bulunurken ( $\chi^2 =12.03$ ,  $P<0.01$ ), K grubu ile İ/R+Q grubu arasında önemli fark yoktu. Quercetin, nötrofillerin iskemik doku içine olan göçünü mast hücre degranülasyonunu inhibe ederek engellemekte ve yangıyı baskılayarak doku hasarını azaltmaktadır.

## 6.SONUÇ

İ/R hasarı, özellikle mikrovasküler cerrahi olmak üzere pek çok durumda halen çözülememiş bir sorundur. İ/R hasarının doğası ile ilgili bilgiler arttıkça önlenmesine doğru adımlarda artacaktır.

Mevcut bilgiler ışığında, olayın multifaktöriyel olması nedeni ile tek bir terapötik ajan kullanarak pek çok faktörü kontrol altına alma ihtiyacı vardır.

Quercetin bitkisel kaynaklı bir madde olup İ/R hasarını; ksantin oksidaz, fosfolipaz A<sub>2</sub>, NADPH oksidaz gibi radikal üreten enzimleri inhibe ederek; serbest radikalleri temizleyerek; nötrofilin göçünü ve aktivasyonunu engelleyerek; mast hücrelerinin degranülasyonunu inhibe ederek azaltmaktadır.

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular şöyledir:

- 1) Latissimus dorsi kas flebi serbest doku aktarımı modelinde Quercetin, hücre membranının iskemi ve serbest oksjen radikallerinden kaynaklanan lipid hasarını, bu hasarın göstergesi olan MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürerek azaltmıştır.
- 2) Bu modelde Quercetin, süperoksit radikalinin spesifik yakalayıcısı olarak bilinen ve endojen antioksidan olan SOD enziminin düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde koruyarak, oksidatif hasardan korunmada hücreye destek sağlamaktadır.
- 3) Bu modelde Quercetin, reperfüzyon sırasında dokuya infiltre olan nötrofil sayısını istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürerek yangısal hasarın şiddetini azaltmıştır.
- 4) Bu modelde Quercetin, doku mast hücrelerinin degranüle olmalarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde önleyerek yangısal hasarın şiddetini azaltmıştır.
- 5) Bu modelde Quercetin, doku mast hücrelerinin toplam populasyonunda, granüle/degranüle oranlarını granüle durum lehine istatistiksel olarak anlamlı şekilde koruyarak mast hücre aktivasyonunu azaltmaktadır.
- 6) Bu modelde, mast hücre aktivasyonu ile nötrofil göçü arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde korelasyon bulunduğu gösterilmiştir.

## 7.KAYNAKLAR

- 1) Pang CY: Ischemia-induced reperfusion injury in muscle flaps: Pathogenesis and major source of free radicals. *Reconstr Microsurg* 1990;6:77-83
- 2) Belkin M, LaMorte WL et al: The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *J Vasc Surg* 1989.10: 14-18,
- 3) Bortolotto SK, Morrison WA et al: Mast cell play a pivotal role in ischaemia reperfusion injury to skeletal muscles. *Lab Invest* 2004.84, 1103-1111,
- 4) Morin D, Hauet T, et al: Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 49 (2001) ;151-174
- 5) Mathes SJ, Nahai F: *Reconstructive Surgery : Principles, Anatomy and Technique* . Volume 11997, 39-46.
- 6) Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, Zoppo DGJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994;25:1847-54.
- 7) Bragnaza JM. Mast cell: Pivotal player in lethal acute pancreatitis. *QJM* 2000; 93:469-74.
- 8) Nijveldt R.J, Nood E, Hoorn D.E.C, Boelens P.G, Noreen K, Leeuwen P.A.M: Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Clin. Nutr.* 2001, 74: 418-425.
- 9) Van Acker SA, Tromp MN, Haenen GR, et al: Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* .1995;214:755-9.
- 10) Priya S.D, Shyamala Devi C.S: Protective effect of quercetin in cisplatin-induced cell injury in the rat kidney. *Indian J. Pharmacol.*1999, 31: 422-426.

- 11) Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S: The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Rad. Bio! Med. 1994; 16: 845-850.
- 12) Kahraman A, Erkasap N, Serteser M, Köken T: Protective effect of quercetin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. J. Nephrol. 2003, 16: 219-224.
- 13) Nakagawa K, Kawagoe M, Yoshimura M, Arata H, Minamikawa T, Nakamura M.: Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generator in hepatic lysosomal fractions of mice. J. Health Science, 2000 ; 46: 509-512.
- 14) Kahraman A, İnal ME: Protective effects of quercetin on ultraviolet a light induced oxidative stress in the blood of rat. J. Appl. Toxicol. 2002,22: 303-309.
- 15) Elliott M, Kandaswami C, Theoharides TC.: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews. 2000; Vol 52(4), 673-751.
- 16) Çağdaş, A ve ark: Estetik Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi. Ege Üniversitesi Basımevi 2003. Bornova-İzmir.
- 17) Akkuş İ: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, 1995. Kuzucular Ofset, Konya.
- 18) Dere F: Anatomi. Cilt 1. Adana1990. s 55.
- 19) Bayramiçli, M: Deneysel Mikrocerrahi (Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri ), İstanbul, 2005, Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret A.Ş.
- 20) Haris K, Walker P, et al. Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. Am J Physiol1986; 250(19):H213-H220,

- 21) İşlekel H, İşlekel S, Güner G: Biochemical mechanism tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. Part 1:Biochemical mechanism. *Norol Bil D*,2000. 17:2
- 22) Schrier RW, Burke TJ: Role of calcium-channel blockers in preventing acute and chronic renal injury. *J Cardiovasc Phar.* 1991;18 (suppl. 6): 38-43.
- 23) Kowaltowski AJ, et al: Ca<sup>2+</sup>- induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *Am J Physiol.* 1995;269 C141-147.
- 24) Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991; 161: 488-502.
- 25) Suval WD, Duran WN, et al: Microvascular transport and endothelial cell alterations precede skeletal muscle damage in ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 1987; 154:211-218.
- 26) Cryer HG: Therapeutic approaches for clinical ischemia and reperfusion injury. *Shock* 8 (1997) 26-32.
- 27) Kristian T, Siesjo BK: Calcium-related damage in ischemia. *Life sci.* 59 (1996) ;357-367.
- 28) Crompton M: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J.* 341 (1999); 233-249.
- 29) Horgan MJ, Ge M, et al: Role of ICAM-1 in neutrophil mediated vascular injury after occlusion and reperfusion. *Am J Physiol* 1991; 259:L315-L319.
- 30) Lefer DJ, Scalia R, et al: Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest* 1997; 4: 684-691.



- 31) McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26: 351-7.
- 32) Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84:2068-2101.
- 33) Gute DC, Ishida T, et al: İnflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Moll Cell Bio* 1998; 179. 169-187.
- 34) Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1998; 254: H823 H827.
- 35) Schlag MG, Harris KA, Potter RF: Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ phsiol.* 2001; 280(4):H1716-H1721.
- 36) Harem MK: Mast hücre proteazları ve biyolojik önemi. *Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2005; 14(1) 61-67 .
- 37) McNeil HP, Gotis-Graham I: Human mast cell subsets— distinct functions in inflammation? *Inflamm Res.* 2000; 49: 3-7.
- 38) Kılınç K. , Kılınç A: Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi,* 2002; 33: 110-118.
- 39) Greenstock C.L: Radiation and aging: Free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med. Hypotheses,* 1993;41: 473-482.
- 40) Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet,* 1994; 344: 721-724.
- 41)Jacob RA, Burri B.J: Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; 63: 985-991.

- 42) David M.G, McCord J.M: Walking a tightrope: The balance between mitochondrial generation and scavenging of superoxide anion. Understanding the process of aging, ed.by/ Cadenas E., Packer L., 1st. Ed., New York, 1999, p.19.
- 43) Beyer RE: The participation of coenzyme Q in free radical production and antioxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 1990, 8: 545-565.
- 44) Boveris A, Costa EL, Cadenas E: The mitochondrial production of oxygen radicals and cellular aging. Understanding the process of aging, ed.by/Cadenas E., Packer L., 15t. Ed., New York, 1999.
- 45) Utsumi K, Takehara Y, Inai Y, Yabuki M, Kanno T: Oxygen-dependent regulation of biological functions by nitric oxide. The mitochondrial production of oxygen radicals and cellular aging. Understanding the process of aging, ed.by/Cadenas E, Packer L., 15t . Ed., New York, 1999, p.60.
- 46) Nakazawa H, Fukuyama N, Takizawa S, Tsuji C, Yoshitake M, Ishida H: Nitrotyrosine formation and its role in various pathological conditions. *Free Rad. Res.* 2000, 33: 771-784.
- 47) Çakatay U, Telci A, Kayalı R, Tekeli F, Akçay T, Sivas A: Relation of aging with oxidative protein damage parameters in rat skeletal muscle. *Clin Biochem.* 2003; 36: 51-55.
- 48) Halliwell B: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 1991, 91: 14-22.
- 49) Mates J.M, Gomez C.P, Nunez de Castro I: Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 1999, 32: 595-603.
- 50) Çetin C,Köse AA, Aral E: Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg* 2001;47:540-546.

- 51) Beyer RE: An Analysis Of The Role Of Coenzyme Q In Free Radical Generation And As An Antioxidant. *Biochem. Cell. Biol.* 1992; 70 : 390-403.
- 52) Greenstock C.L: Radiation and aging: Free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med. Hypotheses.* 1993, 41: 473-482.
- 53) Ikeda J: Lipid Peroxidation Products And Carcinogenesis. 1993 :76 : 1235-1240.
- 54) Ernest L, Dallner G.: Biohemieal, physiologieal and medical aspeets of ubiquinone function. *Bioehim Biophys Aeta*, 1995; 127.1: 195-204.
- 55) Kavas GÖ: Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye klinikleri* 1989;1: 1-8.
- 56) Mc Cord JM: Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985; 312: 159-163.
- 57) Parks DA, Granger DN: Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution, physiology. *Acta Physiol Scand (suppl )* 1986; 548: 87-99.
- 58) Jarasch ED, Bruder G, et al: Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand (suppl )* 1986; 548: 39-46.
- 59) Grisham MB, hernandez LA, Grander DN: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischaemia. *Am J Physiol* 1988; 251: G567-G574.
- 60) Zaccaria A, Weinzweig N et al: Vitamin C reduces ischemia reperfusion injury in a rat epigastrik island skin flap. *Ann Plast Surg* 1994; 33 : 620-623.
- 61) Im MJ, Manson PN et al: Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985; 201:357-359.
- 62) Bast A, Doelman C: Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am J Med.* 1991; 91: 2-13.

- 63) Seven A, Candan G: Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. Klinik Gelişim, 1995; 8: 3906-3911.
- 64) Uysal M: Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengesini etkileyen koşullar. Klinik Gelişim, 1998;11: 336-341.
- 65) Uchida K: Cellular response to bioactive lipid peroxidation products. Free Radic. Res. 2000, 33: 731-737.
- 66) Cutler R.G, Mattson M.P: Measuring oxidative stress and interpreting its clinical relevance for humans. Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances in basic science, diagnostics and intervention, ed.by/ Cutler R.G., Rodriguez H., Vol. I, World Scientific Publishing, Singapore, 2003, p.137.
- 67) Zusterzeel P.L.M, Mulder T.P.J, et al: Plasma protein carbonyls in nonpregnant, healthy pregnant and preeclamptic women. Free Radic. Res. 2000, 33: 471-476.
- 68) Kaynak K: Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. Solunum, 2002,4: 468-473.
- 69) Lenton KJ, Therriault H, Fulop T, Payette H, Wagner J.R: Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. Carcinogenesis, 1999; 20: 607-613.
- 70) Kolanjiappan K, Ramachandran C.R, Manoharan S: Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. Clin. Biochem. 2003, 36: 61-65.
- 71) Most D, Hoyt J, et al: Parenchymal cytokine expression precedes clinically observed ischaemia in dorsal flaps in the rat. Plast Reconstr Surg 1996; 98: 856-861.
- 72) Chi. N, Watanabe A, Shi H: Diverse functions of antioxidants. Free Rad. ARes. 2000, 33. 809-817.

- 73) Yalçın AS: Antioksidanlar. Klinik Gelişim, 1998; II: 342-346.
- 74) Peterson J, Dwyer J: Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. Nutr. Res. 1998, 18: 1995-2018.
- 75) Schroeter H, Spencer J.P.E, Rice-Evans C: Current status of the potential role of flavonoids in neuroprotection. Critical reviews of oxidative stress and aging: advances in basic science, diagnostics and intervention, *ed.by/* Cutler R.G., Rodriguez H., Vol. I, World Scientific Publishing, Singapore, 2003, p.137.
- 76) Tanakol R: Antioksidan vitaminler: Hastalıkta ve sağlıkta önemleri. Klinik Gelişim, 1998; 11: 347-357.
- 77) Burak M, Çimen Y: Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. T. Klin. Tıp Bilimleri, 1999; 19: 296-304.
- 78) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry 1979;95:351-58.
- 79) Winterbourn C.C, Hawkins R.E, Brian M, Carrell R.W: The estimation of red cell superoxide dismutase activity. J. Lab. Clin. Med. 1975, 85: 337-342.
- 80) Çetin C: Ada fleplerinde reperfüzyon hasarı ve serbest radikallere bağlı gelişen flep nekrozunun önlenmesinde E vitaminin etkileri (Deneysel çalışma) 1992. Uzmanlık tezi, Eskişehir.
- 81) Ovalı C: Alt ekstremitenin iskemi reperfüzyon modelinde resveratrol'ün reperfüzyon hasarının önlenmesinde kullanımı (Deneysel çalışma). 2003. Uzmanlık tezi, Eskişehir.
- 82) Uz UZ: Radyasyonla oksidatif hasar oluşturulan ratlarda CoQ ve Quersetin'in birlikte verilmesinin koruyucu etkileri. 2004. Uzmanlık tezi, Eskişehir.

83) Tadolini B, Franconi F: Carvedilol inhibition of lipid peroxidation. A new antioxidative mechanism. Free Radic. Res. 1998; 29 , 377-387.

84) Petrasek PF, Liauw S, et al: Salvage of postischemic skeletal muscle by monoclonal antibody blockade of neutrophil adhesion molecule CD 18. J Surg Res 1994;56: 5-12,

85) De Greef KE et al: Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. J. Nephrol. 1998, 11: 110-122.

86) Grace PA : Ischaemia – reperfusion injury .Br J Surg 1994 ;81 : 637-47

87) Choi JS, Choi YS, Park SH, Kang JS, Kang YH: Flavones mitigate tumor necrosis factor alpha induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor- kappa B. J Nutr. 2004; 134(5):1013-9.