

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON YAPILAN
RATLARDA PİNOCEMBRİN'İN
KORUYUCU ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Osman BARDAKÇI

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali UZUNKÖY**

**ŞANLIURFA
2012**

OSMAN BARDAKÇI

GENEL CERRAHI

UZMANLIK

ŞANLIURFA -2012

T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON YAPILAN
RATLARDA PİNOCEMBRİN'İN
KORUYUCU ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Osman BARDAKÇI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali UZUNKÖY

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 20.10.2011 tarih ve 1185 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2012

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgilerinden ve tecrübelerinden yaralandığım, bana her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanımız olan Prof. Dr. Ali UZUNKÖY olmak üzere, Doç. Dr. Fahrettin YILDIZ, Doç. Dr. Alpaslan TERZİ, Doç. Dr. Abdullah ÖZGÖNÜL ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet ŞEKER' e;

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi birikimini, desteğini ve anlayışını esirgemeyen büyük bir titizlikle hatalarımı düzelten danışman hocam Prof. Dr. Ali UZUNKÖY' e, Patoloji Anabilim Dalı Doç. Dr. İlyas ÖZARDALI' ya, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nurten AKSOY' a;

Araştırma görevlisi olarak çalıştığım süre zarfında sürekli güler yüzlü ve bir arkadaş gibi yaklaşan başta cerrahi branşlarda olmak üzere tüm hastanedeki hocalarıma, tüm resmi konularda ve asistanlıkla ilgili evraklarımızın düzenlenmesinde bizlere engin bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren başta Murat ALKAN olmak üzere tüm personel şubesi çalışanlarına;

Asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan zevk aldığım, ailemden biri olarak gördüğüm Murat KAYA, Sadık ERYILMAZ, Murat SOYALP, İsmail ÇETİNKAYA başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, Genel Cerrahi, ameliyathane hemşire ve personeline;

Bugünlere gelmemde büyük katkı sahibi olan babama, anneme, kardeşime ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim eşim Selda BARDAKÇI' ya;

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

OSMAN BARDAKÇI
ŞANLIURFA 2012

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
RESİMLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	v
GRAFİKLER DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR VE SİMGELER	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnce bağırsaklar.....	3
2.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı patofizyolojisi.....	9
2.3. İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarı Patofizyolojisi.....	15
2.4. Antioksidan Savuma Mekanizması.....	20
2.5. Propolis.....	24
2.6.Pinocembrin.....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
4. BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA.....	45
6. SONUÇ.....	51
7.KAYNAKLAR.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.SMA ve Dalları.....	6
Şekil 2. İMA ve Dalları.....	6
Şekil 3. SMA ve TÇ arasındaki kollateral dal.....	7
Şekil 4. SMA ve İMA arasındaki kollateral dallar.....	8
Şekil 5. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları sonuçları.....	9
Şekil 6. İskemi reperfüzyon Patofizyolojisi.....	11
Şekil 7. Lökosit ve endotel arası etkileşim şeması.....	14
Şekil 8. Pinocembrin kimyasal yapısı.....	26

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Ratlara uygun pozisyon verilmesi ve tesbiti.....	28
Resim 2. SMA ortaya konulması ve klemplenmesi.....	28
Resim 3. İntestinal iskemi oluşturulması.....	29
Resim 4. Normal bağırsak mukozası.....	42
Resim5. Kontrol grubundaki örnekte, lamina propiada parçalanma ülserasyon ve hemoraji.....	43
Resim 6. PC grubundaki örnekte villuslarda kapiller konjesyon ve ödem.....	43
Resim 7. PC grubundaki örnekte epitelyal tabakanın lamina propiadan ayrışması.....	44

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Sham ve kontrol gruplarında plazma parametrelerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.....	35
Tablo 2. Sham ve kontrol gruplarında doku parametrelerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.....	36
Tablo 3. Kontrol ve PC gruplarında plazma parametrelerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.....	38
Tablo 4. Kontrol ve PC gruplarında doku parametrelerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.....	40
Tablo 5. Chiu'nun histopatolojik hasar skorlaması.....	41
Tablo 6. Gruplardaki deneklerin Chiu sınıflamasına göre dağılımları.....	42

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Kontrol ve PC grubunda plazma AST, ALT, LDH değerlerinin karşılaştırılması	37
Grafik 2: Tüm gruplardaki plazma ve doku OSİ değerlerinin karşılaştırılması..	37
Grafik 3: Kontrol ve PC gruplarında doku AST, ALT ve LDH değerlerinin karşılaştırılması.....	39

KISALTMALAR VE SİMGELER

ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
AMP	Adenozin monofosfat
CAT	Katalaz
GSSH	Glutasyon
GPx	Glutasyon peroksidaz
GRx	Glutasyon Redüktaz
HE	Hematoksilen-Eozin
SMA	Süperiyor Mezenterik Arter
İMA	İnferior Mezenterik arter
TÇ	Trunkus Çöliyakus
XDH	Ksantin dehidrojenaz
XO	Ksantin oksidaz
LDH	Laktat Dehidrojenaz
PL A ₂	Fosfolipaz A ₂
MPO	Myeloperoksidaz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
Fe ⁺²	Demir
Ca ⁺²	Kalsiyum
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAC	Total Antioksidan Kapasite
TAS	Total Antioksidan Seviye(Status)
TOS	Total Oksidatif Stres

PC	Pinocembrin
NVU	Nörovasküler Ünite
SOR	Serbest Oksijen Radikali
EB	Evans mavisi
NaF	Flourescan sodyum
GCI	Global İskemi/Reperfüzyon
CBF	Serebral Kan Akımı
OGD/R	Oksijen glukoz yoksunluk/reoksijenizasyonu
MMP-9	Metaloproteinaz-9
İR	İskemi Reperfüzyon
İRH	İskemi Reperfüzyon Hasarı
İİRH	İntestinal İskemi Reperfüzyon Hasarı
NO	Nitrik Oksit
O ₂	Oksijen
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
MODS	Çoklu Organ Yetmezliği
İPDA	İnferior Pankreatikoduodenal Arter
SPDA	Süperior Pankreatikoduodenal Arter
O _{2i}	Süperoksit Radikali
OH ⁻	Hidroksil kökü
OH _i	Hidroksil Radikali
TxA ₂	Tromboksan A ₂
NFkB	Nükleer faktör-kB
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
ET	Endotelin
RCI	Respirasyon kontrol rat indeks
OPR	Oksidatif fosforilasyon oranı
RCMECs	Serebral mikrovasküler endotelial hücre kültürleri

ÖZET

İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON YAPILAN RATLARDA PİNOCEMBRİN’NİN KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Osman BARDAKÇI

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Amaç: İntestinal iskemi reperfüzyon hasarı (İİRH), patofizyolojisi hala tam olarak anlaşılabilen, mortalitesi yüksek bir problemdir. Pinocembrin, propoliste bulunan flavonoidlerden biridir. İn vivo ve in vitro olarak yapılan çalışmalarda, pinocembrinin serebral iskemi ve reperfüzyon hasarında koruyucu etkisinin olduğunu, ayrıca kolon kanser hücrelerinde apoptozisi tetiklediğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir. Biz bu çalışmamızda daha önceki yapılan çalışmalarda ışığında pinocembrinin (PC) İİRH’ na bağlı koruyucu etkisinin olup olmadığını bulmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: 30 adet dişi Wistar Albino rat sham, kontrol ve PC tedavi grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna ve PC grubundaki ratlara 60 dakika bağırsak iskemisi ve takiben 60 dakika reperfüzyon uygulandı. Pinocembrin grubundaki ratlara iskemi öncesi ve reperfüzyon öncesi intraperitoneal olarak 5 mg/kg PC verildi. Ratlar, kan örnekleri ve bağırsak dokuları alındıktan sonra sakrifiye edildi. Plazma ve dokuda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri

araştırıldı. Ayrıca plazma ve dokuda total antioksidan seviye(TAS), katalaz(CAT), total oksidatif seviye(TOS), oksidatif stres indeksi(OSİ), myeloperoksidaz(MPO) ve prolidaz değerleri ölçüldü. Aynı zamanda bağırsak dokusu ışık mikroskobu ile histopatolojik olarak incelendi. İstatistiksel değerlendirmede $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Pinocembrin grubunda kontrol grubuna oranla AST, ALT, LDH enzim seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük bulundu($p < 0.05$). Plazma ve intestinal dokuda MPO, TOS, OSİ ve ploidaz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşme tespit edildi($p < 0.05$). Ayrıca katalaz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme tespit edildi($p < 0.05$). TAS değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi($p > 0.05$). Histolojik olarak doku hasarı PC grubunda, kontrol grubuna oranla daha hafif olarak değerlendirildi.

Sonuç: Çalışmamız da PC'nin intestinal iskemi ve reperfüzyon hasarında koruyucu etkisinin olduğu ortaya konulmuştur. Ancak, literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle maksimum etki için, doz, verilış şekli ve zamanı ayrıca etki mekanizması açısından ek çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Pinocembrin, iskemi reperfüzyon hasarı, İntestinal, rat

ABSTRACT

PROTECTIVE EFFECT OF PINOCEMBRINE ON RATS THAT INTESTINALE İSCHEMİA AND REPERFUSİON PERFORMED

Dr. Osman BARDAKÇI

Department of General Surgery

Medical Specialization Thesis

Background: The Intestinal ischemia reperfusion damage whose pataphysiology is still not understood is a problem of high mortality. Pinocebrine is one of the flavonoids which is found in the propolis. It is declared in the studies which are carried out as in vivo and in vitro that pinocebrine has the protective effect in the damage of the cerebral ischemia and reperfusion and also it triggers apopitozis in the colon cancer cells. The aim of this study, with the help of the previous studies, is to find out whether the pinocebrine has the protective effect in the damage of the intestinaleischemia and reperfusion or not.

Materials and Methods: 30 female Wistar Albino rats shams are classified into three groups as the control and the PC treatment groups. Intestine ischemiais applied to the rats which are in the control and the PC treatment groups for 60 minutes and after then, 60 minutes of reperfusion. 5 mg/kg PC is given to the rats which are in the pinocebrine group

before ischemia and reperfusion as intraperitoneal. The rats are sacrificed after their blood samples and intestine tissues are drawn. aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) levels are studied in the plasma and the tissue. Moreover, antioxidant level (TAS), catalase (CAT), total oxidant status (TOS), oxidant stress index (OSI), myeloperoxidase (MPO) and proinflammatory cytokine levels are measured in the plasma and tissue. At the same time, the intestine tissue is studied histopathologically with light microscope. Statistical analysis $p < 0.05$ was considered significant.

Results: AST, ALT, LDH enzyme levels are found low statistically in significant rate in the pinocembrine group compared to control group ($p < 0.05$). A significant decrease is statistically figured out in the levels of MPO, TOS, OSI and proinflammatory cytokine of the plasma and intestinal tissue ($p < 0.05$). Moreover, a significant increase is statistically figured out in the catalase levels ($p < 0.05$). A significant result is not statistically gained in the TAS levels ($p > 0.05$). The histologic tissue damage is assessed less in the PC group compared to control group.

Conclusion: It is proved in our study that the pinocembrine has the protective effect in the damage of the intestinal ischemia and reperfusion. Due to being the first study in the literature, it needs some extra studies of the dose, medication type and time for maximum effect and effect mechanism.

Key Words: Pinocembrine, ischemia reperfusion damage, intestinal, rat

1.GİRİŞ

İnce bağırsak iskemi reperfüzyon hasarı(İRH), ciddi ve sık görülen klinik bir hadisedir. Bu durum şiddetli yerel veya yaygın doku hasarına neden olmaktadır. Aortdaki aterom plaklarından kaynaklanan süperiyor mezenterik arter(SMA) embolisi mezenter iskemisinin en fazla görülen sebebidir(1). SMA'nın aortadan geniş açılı ile çıkması ve aorta paralel seyretmesi embolik tıkanmalara diğer intestinal damarlardan daha yatkın olmasına neden olmaktadır. Bağırsak iskemisi arteriyel tromboz, emboli, Henoch-Schonlein purpurası, dissemine intravasküler koagülasyon gibi damar içi patoloji veya volvulus, invaginasyon, boğulmuş kasık fitiği, tümör, fibrotik bant gibi damar dışı nedenlerle de oluşmaktadır. Ayrıca sistemik hipertansiyon, vazokonstriksiyon, kan viskozite bozukluğu, ateroskleroz ve hipotansiyon gibi nedenlerle de ince bağırsak iskemisi gözlenebilir(2).

İntestinal iskemi reperfüzyon hasarı(İRH) sonucunda meydana gelen olaylar yalnızca bağırsakları etkilemeyip, birbirine bağımlı mekanizmaların aktive olması sonucunda ortaya çıkan toksik ürünler sebebiyle, başta akciğer ve karaciğer olmak üzere kalp, beyin, böbrekler gibi uzak organ hasarı meydana getirir ve çoklu organ yetersizliğine (MODS) sebep olabilir(3).

Serbest oksijen radikalleri(SOR) ve hücre hipoksisi İRH'nin patogenezinin sorumludur. Dokunun iskemi süresince kanlanması yeterli olmaması, extraselüler aralığa nötrofillerin göçüne neden olur. Nötrofillerden salınan myeloperoksidaz(MPO) enzimi de kapiller por aralığının genişlemesine neden olur. Ayrıca, hipoksi sonucunda ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaz'a dönüşmekte ve bu enzim reperfüzyon sırasında, serbest oksijen radikallerinin yapımında görev almaktadır. SOR ise lipid peroksidasyonunu başlatmakta ve bunun sonucunda hücre membranının lipid yapısını bozarak doku hasarına sebep olmaktadır(4,5).

İntestinal İRH oluşmasında iki mekanizma söz konusudur. Bunlardan birincisi SOR'nin açığa çıkması, ikinci olarak da fosfolipaz A₂(PL A₂)'nin iskemik dönemde aktive olarak membranlardaki yağ asitlerini parçalamasıdır(3).

İntestinal iskemik hasar, ilk önce bağırsak mukozasının villus tabakasında meydana gelir(6). Villus uçlarındaki iskemik doku hasarı, kan akımında kısa süreli azalmalarda bile ağır hipoksi oluşturarak meydana gelebilir. Önce kapiller, ardından mukozal permeabilite

artışı sonucunda mukozada oluşan doku hasarını, transmukozal ve transmural hasar izler. İntestinal iskemi kritik ve septik hastalarda yüzeysel mukozal hasara neden olurken; strangülasyon, mezenterik vasküler oklüzyon, nonokluziv obstrüksiyon olarak bilinen durumlar ise, daha derin doku hasarına sebep olabilirler(7).

Vücutta dokuları serbest oksijen radikali aracılığıyla oluşan hasara karşı koruyan endojen bir antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır. Bunların en önemlileri; superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz enzimleri ile A,C ve E vitaminleridir. Ancak bu sistemler, reperfüzyon fazında oluşan yüksek miktarda serbest oksijen radikallerinin eliminasyonunu sağlayamamaktadır. Bu nedenle iskemi reperfüzyon hasarının tedavisinde çeşitli antioksidanlar denenmektedir(8).

Propolisler bal arıları tarafından toplanan ürünlerdir. Propolisin tıbbi olarak faydaları tarihsel olarak çok eski zamanlardan beri tespit edilmiştir. Yıllar boyunca propolis insanlar tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde uygulanmıştır. Propolisin önemli bir bileşeni olan flavonoidlerin, anti-inflamatuar, antioksidan, serbest radikal temizleyici, antitümoral, hepatoprotektif, vasküloprotektif, antiülser, intestinal motilite ve sekresyon inhibisyonu, antiosteoprotik, antialerjik, antimikrobiyal ve immünomodülatuar özellikleri rapor edilmiştir(9).

Pinocebrin(PC), (5,7-dihydroxyflavanone) propoliste en yüksek konsantrasyonlarda bulunan flavonoiddir(Bankova ve ark.1982). Pinocebrin'in antimikrobiyal(Park ve ark 1998; Uzel ve ark 2005), vasorelaksatif(Zhu ve ark 2007), antioksidan(Sala et al 2003; Santos ve ark 1998), anti-inflamatuar(Habtemariam 1997; Sala ve ark 2003) ve antiapoptotik özellikleri(Liu ve ark 2008; Santos ve ark 1998) mevcuttur(10).

Biz bu çalışmamızda, yukarıda saydığımız bu özelliklerinden dolayı, daha önce yapılan değişik çalışmalarda nöronal iskemi reperfüzyon(İR) modellerinde kullanılıp etkisinin olduğu tespit edilen, ayrıca kolon kanserinde de koruyucu etkisinin olduğu gösterilen PC'in intestinal iskemi ve reperfüzyon hasarında koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Şok, yanık, sepsis, pankreatit gibi olgularda meydana gelen ve dokulara giden kan akımının azalması sonucu iskemi ve bu durumların resüsite edilmesi ile de reperfüzyon hasarı oluşmaktadır.

Serebrovasküler olaylarda, miyokard infarktüsünde, mezenterik vasküler olaylarda uygulanan trombolitik tedavi veya revaskülarizasyon ameliyatları sonucunda da yine reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir. Travma ve travma cerrahilerinde kanama kontrolü yapmak amacıyla tampon uygulamaları iskemiye neden olurken, resüsitasyon sonrası reperfüzyon ile yine İRH meydana gelmektedir. Kardiyovasküler cerrahide aortik ya da periferik arteriyel klemp uygulaması sonucunda ortaya çıkan tablo İRH ile karakterizedir. Transplantasyon cerrahisinde de kaçınılmaz olarak transplante edilecek organın iskemi ve reperfüzyonu söz konusu olup, meydana gelen hasar sonucu greftin fonksiyonları etkilenmektedir. Bütün cerrahi işlemler sırasında sonuç olarak mutlaka dokuların iskemisi ve sonrasında reperfüzyon süreci vardır(11).

2.1. İnce Bağırsaklar

2.1.1. Anatomisi

Karın boşluğunun büyük bir bölümünü kaplayan ve onun içinde oldukça serbest hareketli olan incebağırsaklar, pilordan ileoçekal bileşkeye kadar uzanan sindirim kanalının en uzun bölümünü oluşturur. Yaklaşık olarak 7 m uzunluğunda olan incebağırsaklar duodenum, jejunum ve ileum olmak üzere üç bölümde incelenir(12).

İnce barsak duvarı üç tabakalıdır:

1. **Tunika mukoza:** Mukoza ince bağırsakların üst bölümünde kalın, alt bölümünde ince damarlardan zengin tabakadır. Makroskopik olarak da seçilebilen iki yapı vardır;

a. Kerkring valvülleri: Bağırsak lümenini, sirküler ya da spiral biçimde saran, mukoza kıvrımlarıdır. Mukozanın dört laminasında içeren lineer kıvrımlardır, germe ile düzleşmezler.

b. Villus: Makroskopik olarak tüm mukoza yüzeyinde seçilebilen küçük parmak ya da yaprak biçimindeki mukoza çıkıntılarıdır.

2. Tunika muskularis

3. Tunika seroza

2.1.2. Duedonum

Duedonum yaklaşık 30 cm uzunluğunda C şeklinde lümenli bir organ olup pilordan flexura duodenojejunalise (L2 hizasında ve orta hattın solunda) kadar uzanır. L1 hizasında orta hattın sağından başlayıp, önce arka ve yukarı doğru, sonra da L3-L4 düzeyine kadar alçalan bir yol izler. Duedonum dört kısımda incelenir.

a. Pars superior, klinikte bulbus olarak isimlendirilir ve intraperitonealdir.

b. Pars descendens, karaciğer ve pankreasın salgılarının döküldüğü bölümdür. Retroperitoneal yerleşimlidir.

c. Pars horizontalis, retroperitonealdir.

d. Pars ascendens, duodonumun son kısmıdır. Treitz bağı ile karın arka duvarına yapışıktır(13)

2.1.3. Jejunum ve İleum

Flexura duodenojejunalis ile ostium ileocaecale arasındaki ince bağırsak kısmıdır. Makroskopik olarak, jejunum ve ileumu birbirinden ayıran kesin bir hat yoktur. Ancak bir kural olarak jejunumun karın sol alt tarafında, ileumun ise karın sağ alt tarafında yer aldığı belirtilmektedir. Tüm jejunum, ileum ve bunların mezenterleri visseral peritonla örtülüdür. İnce bağırsak mezenteri sol üstte duodenojejunal bileşkeden (Treitz bağı, ikinci bel omuru düzeyi) sağ altta ileoçekal bileşkeye uzanır ve boyu yaklaşık 15 cm'dir. İnce bağırsağı bir yelpaze gibi açılarak, karın arka duvarına asmaktadır. Peritondan oluşan yapraklar arasında

bağırsakların arterleri, venleri, lenfatikleri, lenf ganglionları, visseral sinirleri ve değişik miktarlarda yağ dokusu bulunur(13,14).

2.1.4. Mezenterik Vasküler Anatomi

Aorta abdominalis'ten köken alan 3 ana arterden beslenir.

2.1.4.1 Turunkus Çölyakus(TÇ)

T₁₂- L₁ seviyesinde abdominal aorta'dan ayrılır. Sıklıkla 3 ana dal verir; sol gastrik arter, ana hepatik arter ve splenik arter(12). Çölyak arterin akut oklüzyonu midgut ve hidgutta akut arteriyel sendromların meydana gelmesine genellikle sebep olmaz(15).

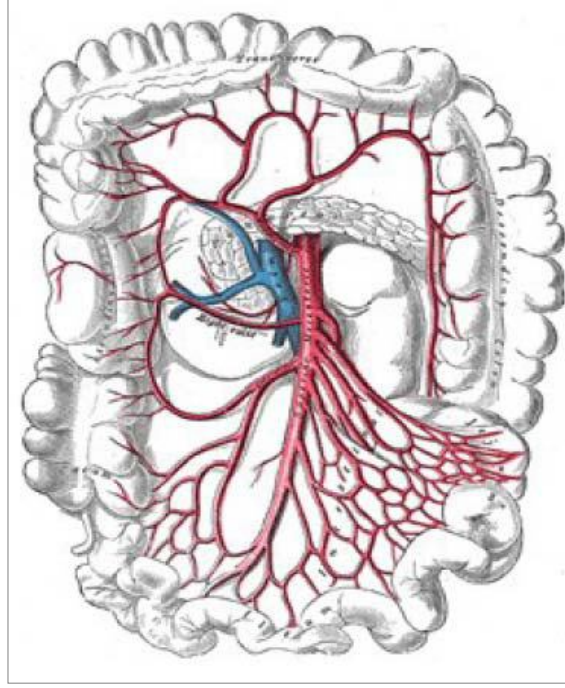
2.1.4.2. Süperior Mezenterik Arter(SMA)

Aorta abdominalis' ten çölyak arterin yaklaşık 1 cm altından, L₁ vertebra seviyesinde ayrılır. SMA bağırsakların etrafında rotasyon hareketlerini gerçekleştirdikleri eksendir.

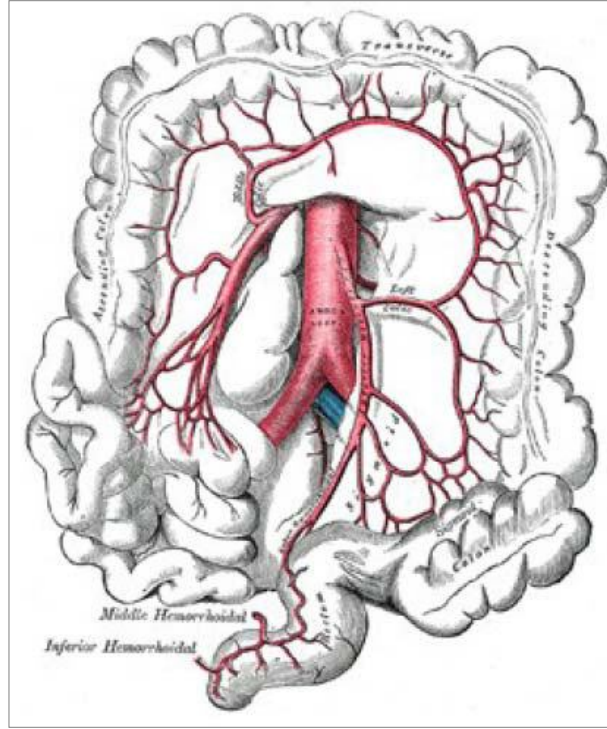
SMA'nın en önemli dalları, inferior pankreatikoduodenal arter, jejunal dallar, ileal dallar, ileokolik arter, sağ kolik arter ve orta kolik arterdir. Orta kolik arter % 22 vakada bulunmaz. Sağ kolik arter hastaların %10'unda bulunmaz(15)(Şekil 1).

2.1.4.3. İnferior Mezenterik Arter(İMA)

L₃ düzeyinde abdominal aortadan, duodenum 3. parçasının altından doğar. Asendan ve desendan dallara ayrılır. Dalları, sol kolik, marjinal ve sigmoid arterler olup splenik fleksuradan rektumun süperior bölümüne kadar olan bölgeyi beslemektedir(Şekil 2).



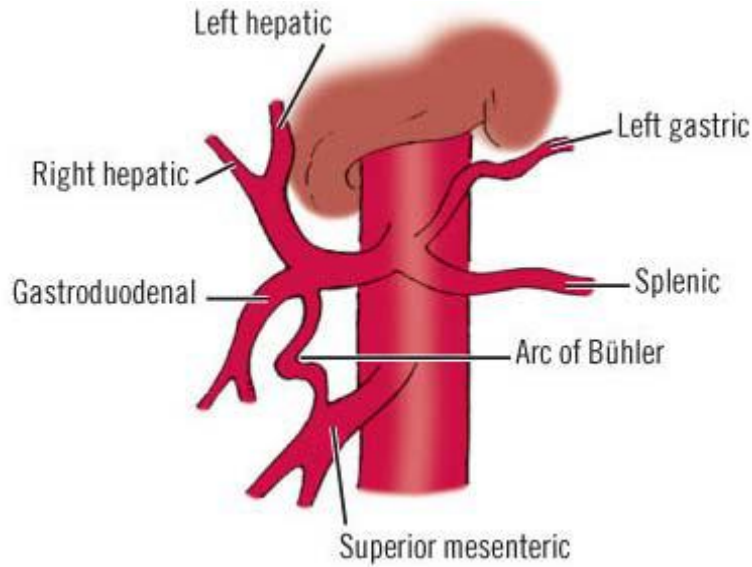
Şekil 1. SMA ve dalları(16)



Şekil 2. İMA ve dalları(16)

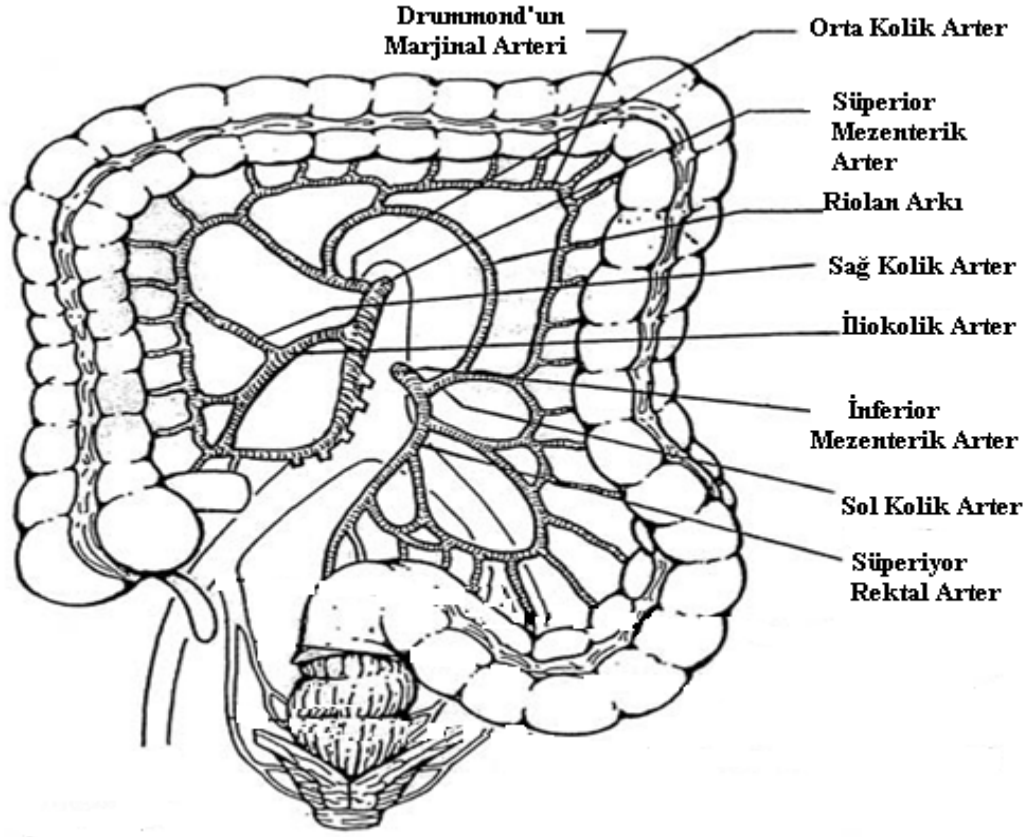
Mezenterik damarların tıkanması durumunda kollateral dolaşım intestinal iskemiye karşı koruyucu bir rol üstlenir. Bir mezenterik arter tıkanığında, tıkanıklığın distalinde oluşan arteriyel hipotansiyona yanıt olarak mevcut kollateral damarlar hemen açılırlar. Distaldeki basınç sistemik basınçtan düşük olduğu sürece bu kollateral dolaşımdaki akım artarak devam eder (17,19).

SMA'nın ilk dalı inferior pankreatikoduodenal arterdir (İPDA). İPDA'nın ön ve arka dallarının TÇ ile olan ilişkisi süperior pankreatikoduodenal arter (SPDA) aracılığıyla. SMA ve TÇ arasında Pankreatikoduodenal arter ve gastroduodenal arterler aracılığıyla, bir kollateral ağ mevcuttur. SMA'nın omental dalı ile TÇ arasında gelişebilen embriyonik bir kalıntı olan Bühler arkı ve Barkow arkı mevcuttur(17,18)(Şekil 3).



Şekil 3. SMA ve TÇ arasındaki kollateral dal(20)

SMA ile İMA arasında üç tane önemli kollateral anastomoz ilişkisi mevcuttur. Bunlardan birincisi ve en önemlisi, Drummond'un marjinal arteridir. Bu arter, kolon duvarına yakın ve paralel lokalizasyonda seyreden bir anastomoz ağıdır ve sonunda vasa rektaları verir. İMA'nın sol kolik arterleriyle SMA'nın sağ ve orta kolik arterlerinin arasında oluşmuş bir anastomozdur. SMA veya İMA tıkanığı zaman bu arter genişler. İkinci önemli ilişki Riolan arkıdır. Riolan arkı mezenter içinde ve daha merkezde olup, splenik fleksura düzeyinde SMA'nın orta kolik ve İMA'nın sol kolik dalı arasındadır(Şekil.4). Üçüncü önemli ilişki ise SMA ile İMA arasında bulunan Meandering arteridir ki, varlığı daima mezenterik arteriyel tıkanmayı işaret eder(17,18).



Şekil 4. SMA ve İMA arasındaki kollateral dallar

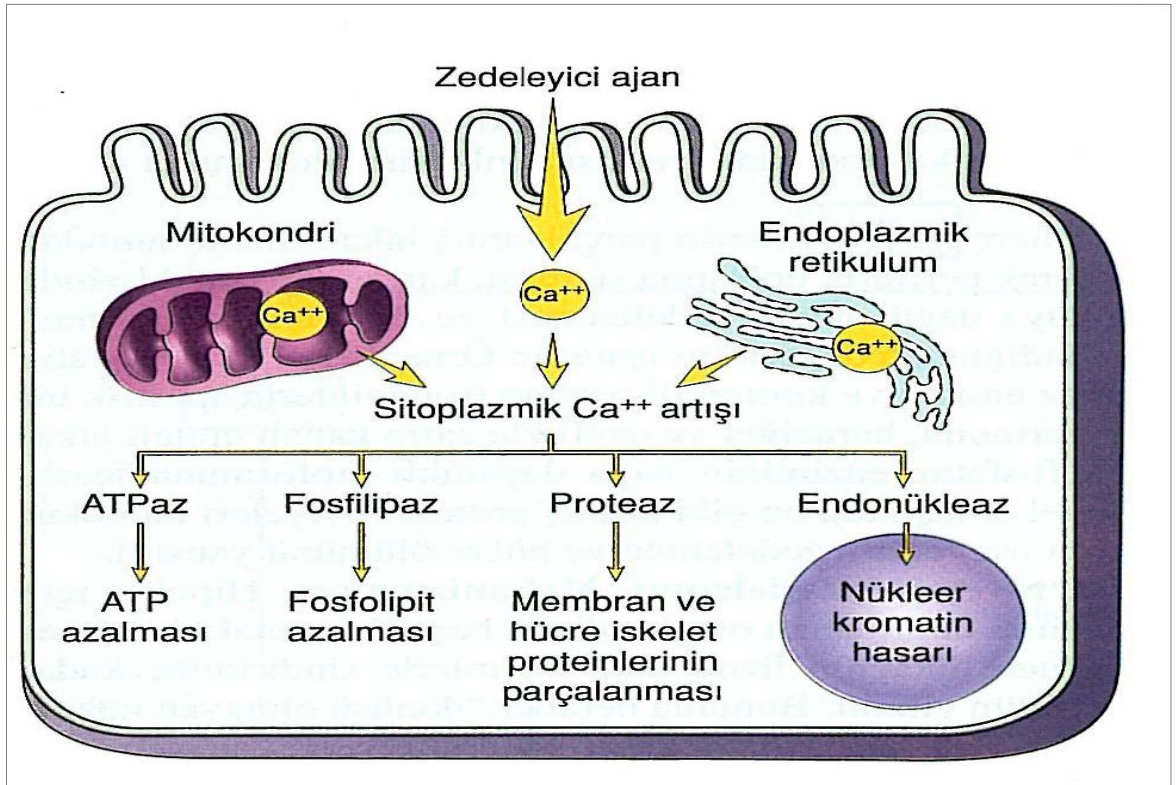
2.2. İskemi reperfüzyon patolojisi:

2.2.1 İskemi:

Bir dokunun pıhtı veya mekanik etken gibi herhangi bir nedenle arteriyel veya venöz kan akımının azalmasıyla birlikte dokunun yetersiz perfüzyonu sonucunda hipokside kalmasına ve buna bağlı beslenmesinin bozulmasına iskemi denmektedir(21).

İskemi sırasında oksijenin dokulara gitmemesi sonucunda hücre faaliyetlerinin bozulmasına, hatta hücrelerin ölümüne neden olan bir kısım kimyasal olaylar dizisi başlar. İskeminin hücrede ilk etkilediği organel mitokondridir. ATP miktarındaki azalma sodyum(Na^+)/potasyum(K^+) ATP az enziminin inhibisyonuna neden olur. Buna bağlı olarak hücre içerisinde Na^+ ve su(H_2O) artışı meydana gelir. Hücre dışı K^+ artışı olur. Na^+ artışı ile

Na^+ /kalsiyum(Ca^{+2}) ve Na^+ /hidrojen(H^+) pompaları aktive olur. Bunun sonucunda da hücre içerisine Ca^{+2} ve H^+ girişi başlar. Hücre içi Na^+ artışı membranda depolarizasyon yaparak, voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının açılmasına neden olarak, hücre içi Ca^{+2} miktarında artış meydana gelir. Hücre içinde Ca^{+2} artması sonucunda aktive olan fosfolipaz, fosfolipidlerin parçalanmasına neden olur. Araşidonik asit meydana gelerek serbest radikal oluşturan siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolları aktive olur. Hücre içerisinde artan serbest Ca^{+2} , kalsiyuma bağımlı ATP az enzimini aktive ederek hücre içi adenosin trifosfat(ATP) miktarı azalmaktadır(22,23). Yüksek Ca^{+2} seviyeleri, mitokondride oksidatif fosforilasyonu ve enerji üretimini azaltır(23). Ayrıca yüksek Ca^{+2} seviyeleri serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır(24). Hücre içi Ca^{+2} artışı sonucunda proteaz aktivasyonu sonucunda ksantin oksidaz(XO) enziminin ortaya çıkması, nötral proteazlar ve lizozomal proteazların aktivasyonu ile de hücre iskeleti, protein yapıların yıkılması sonucu geri dönüşümsüz hasar meydana gelmektedir(22)(Şekil 5).



Şekil 5. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik kalsiyum artışının kaynakları ve sonuçları(25).

Hücre içi ATP miktarında azalma ile birlikte adenosin monofosfat(AMP) miktarının artması sonucu, fosfofruktokinaz enzimini aktive ederek, glikojenden hücrenin enerjisinin

sağlanması amacıyla anaerobik glikoliz yolu aktive olur. Sonuç olarak, glikojen miktarı azalır. Artan anaerobik glikolizle de fosfat esterlerinin parçalanması sonucu laktik asit ve inorganik fosfatların hücre içerisinde artmasına neden olarak hücre içi pH'nın düşmesi ve bunun sonucunda asidoza yol açar(25).

İskemi süresince ATP üretimi kısıtlıdır, fakat yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için ATP gerekmektedir. ATP' den enerji elde etmek için adenosin difosfat(ADP)'a daha sonrada adenosin'e indirgenmektedir. Adenosin, intrasellüler alanda inozine, sonrada hipoksantine dönüşür. Normal dokuda hipoksantin, XO aracılığıyla ürik aside dönüşerek atılır. İskemik dokuda yeterli O₂ olmadığında hipoksantin dokuda düzeyi artmaktadır(26).

2.2.2 Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemiye maruz kalan doku ya da organların tekrar kanlanması ile hücrelerin yeniden oksijenlenmesinin meydana gelmesidir. Doku reperfüzyonunun, iskemik dokuda iki olumlu etkisi vardır. Bunlar, enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılmasıdır. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu paradoksik olarak daha fazla hasara neden olmaktadır(27). Reperfüzyon hasarının bilinen en az üç bileşeni mevcuttur. Bunlar;

- 1 -Mikrovasküler hasar
- 2 -Hücre nekrozu
- 3 -Hemoraji

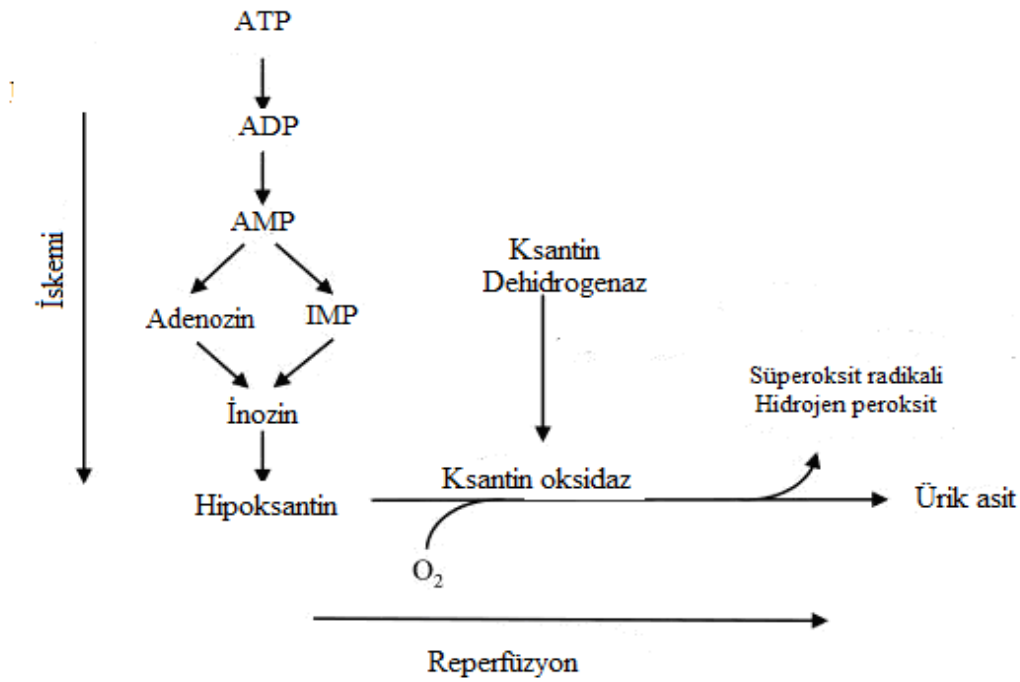
Reperfüzyon hasarı iskemiye maruz kalan her organda meydana gelmektedir. İskemi süresinde bazı biyokimyasal olayların meydana gelmesi sonucunda süperoksit anyonu, hipoklorik asit(HOCl) ve hidrojen peroksit(H₂O₂) gibi reaktif oksijen metabolitleri ile beraber hücre içi Ca⁺² değerleri yükselir. Ayrıca sarkolemmal fosfolipitlerin kaybı da oluşur(28,29).

Günümüzde iskemi reperfüzyon hasarı oluşumunda temel 2 mekanizma ortaya atılmıştır.

1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu
2. PL A₂'nin aktive olması

XO, iskemi reperfüzyon hasarında serbest radikal oluşumuna neden olan en önemli enzimdir. Bu enzim, normal hücrelerde nikotinamid dinükleotid (NAD⁺)'e bağımlı ksantin

dehidrogenaz(XDH) halinde bulunur. XDH normal sağlıklı hücrelerde reaktif SOR üretmezler. Pürinlerin oksidasyonu sırasında enzimin bu formu elektron alıcısı olarak NAD^{+} 'ı kullanır. İskemi sırasında XDH, formunu değiştirerek XO olur. Hücre içinde ATP iskemi süresi boyunca, hipoksantin ve ksantine dönüşerek hücre içi enerji miktarında azalmaya neden olur. Hipoksantin ve ksantin, XO için iyi birer substrat olurlar. İskemik süreçte birikmiş olan hipoksantin ve ksantin, XO aracılığında reperfüzyonun başlaması ile ortama katılan moleküler O_2 ile reaksiyona girerek, süperoksit radikali(O_{2i}) ve H_2O_2 meydana getirirler.



Şekil 6. İskemi reperfüzyon Patofizyolojisi

Serbest oksijen radikallerinin ilk oluşanı O_{2i} ' dir. O_{2i} , genellikle stabil değildir ve hemen H_2O_2 ve O_2' e dönüşür. Dokuda şiddetli hasara neden olan oksijen radikallerinin öncüsü olması nedeniyle O_{2i} önem arz etmektedir. H_2O_2 yavaş ve zayıf bir oksidandır ve katalaz enziminin katalize etmesi sonucunda ile H_2O ve O_2' e yıkılır. Reperfüzyon sırasında H_2O_2 , O_{2i} ile reaksiyona girerek hidroksil kökü(OH^-) ve hidroksil radikali(OH_i) yıkılır. Reperfüzyon hasarından sorumlu olan asıl radikal OH_i 'dir. Bu radikalın asıl özelliği, hidrojen iyonlarını poliansatüre yağ asitlerinden ayırarak yağ asitlerini parçalamasıdır(30).

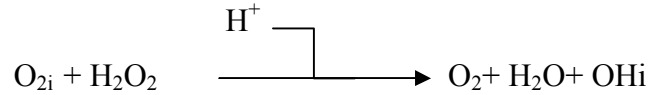
Hidroksil radikali, Haber-Weiss reaksiyonu ve demirin(Fe^{+2}) katalize ettiği Fenton reaksiyonu olmak üzere iki ana yoldan oluşur.

2.2.2.1 Haber-Weiss Tepkimesi

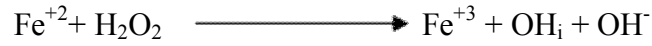
En toksik ve reaktif olan OH_i bu reaksiyonla oluşur. Haber-Weiss reaksiyonu Fe^{+2} katalizörlüğünde gerçekleşir. Bu reaksiyon sonucunda da OH_i , OH^- ve O_2 oluşmaktadır(29).

2.2.2.2 Fenton reaksiyonu:

Hidrojen peroksit Fe^{+2} ve diğer geçiş metalleri varlığında indirgenerek OH_i meydana gelir.



Fenton reaksiyonu



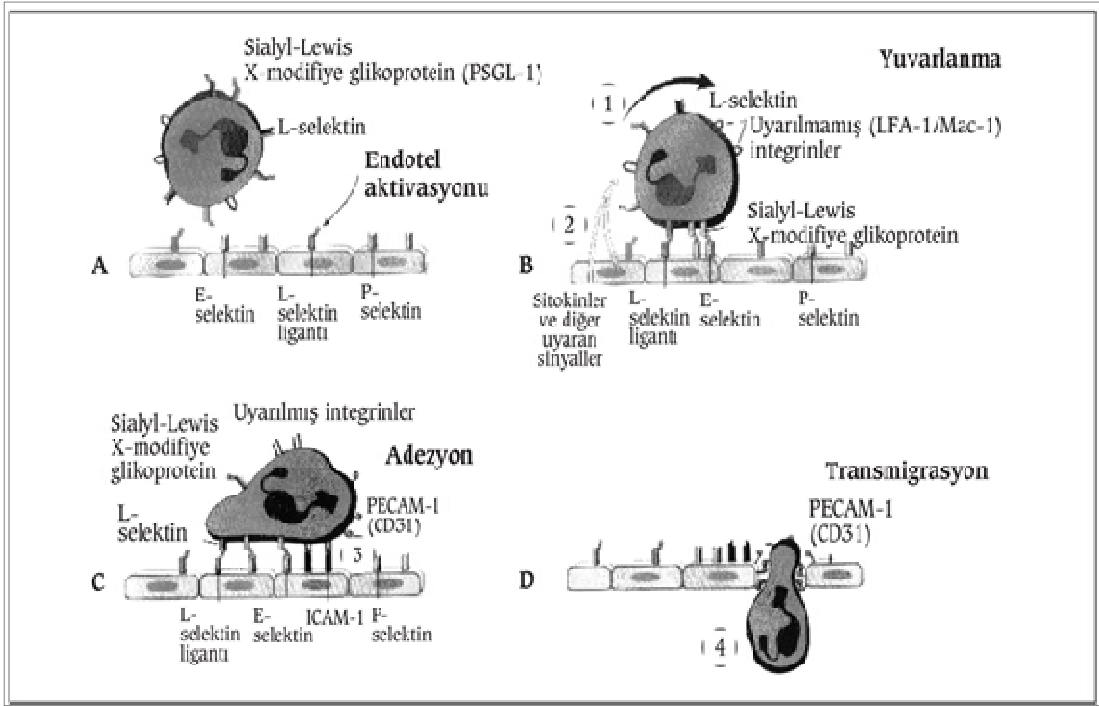
Heber-Weiss reaksiyonu

Reperfüzyon sırasında, hücre içine Ca^{+2} akışının artması ya da endojen PL A₂ inhibitörlerinin inhibisyonu sonucunda PL A₂ aktivasyonuna neden olur. PL A₂'nin görevi, yağ asitlerini membran fosfolipitlerinden ayırmaktır. Bu işlem sonucunda lesitinden lizolesitin, sefalinden lizosefalin ve fosfatidilkolinden lizofosfatidilkolin meydana gelir. Bu ürünlerin büyük kısmı iskemik dokular için toksik özellik göstermektedir. Özellikle lizofosfatidilkolin konsantrasyonunun yükselmesi hücre için toksik olup reperfüzyon sonrası fosfolipaz aktivasyonu ile paralellik göstermektedir. Bunun sonucunda hücre geçirgenliği iskemi sonrasında artmaktadır(31).

XDH' nin XO 'ya dönüşümünde Ca^{+2} iyonları gereklidir ve reperfüzyon sırasında serbest Ca^{+2} belirgin bir şekilde yükselmektedir. Bu yükselme PL A_2 'nin aktivasyonunda önemli bir basamaktır. PL A_2 aktivasyonu sonucunda siklooksijenaz yolu ile prostoglandinler, lipooksijenaz yolu ile lökotrien B_4 (LT B_4) ve diğer araşidonik asit metaboliti olan tromboksan A_2 (Tx A_2) oluşur. Tx A_2 , LT B_4 gibi güçlü bir kemotaktik ajandır ve elastaz gibi proteolitik enzimleri artırarak, O_2 radikallerinin artışına neden olurlar. Membran fosfolipitlerinin, aktive olan fosfolipaz tarafından parçalanması sonucu ise hücre bütünlüğü bozulur. Ayrıca, reperfüze olan dokuda nötrofil aktivasyonu ve birikimine neden olur(32).

Reperfüze olan dokuda nötrofiller migrasyon yaparak birikirler. Nötrofiller, proteolitik enzim sentezinden ve oksijen metabolitleri oluşumundan da sorumludurlar. Nötrofillerden salınan elastaz, jelatinaz ve kollajenaz gibi proteolitik enzimler sayesinde endotel hücrelerinin yıkılmasından da sorumludurlar. İskemi reperfüzyon hasarının oluşum basamaklarında damar endotel bütünlüğünün bozulması da ciddi bir rol oynamaktadır. SOR' un kendisi nötrofiller ve proteazlar dışında direkt endotel hasarına neden olmaktadır. Endotel hasarı sonrasında ortaya çıkan sitotoksik mediyatörler sonucunda intersitisyel alana sıvı kaybı nedeniyle intersitisyel ödem meydana gelir. Sıvı kaybı sonucunda hemokonsantrasyon oluşur. Kapiller lümen daralarak perfüzyon daha çok bozulur(33,34).

Nötrofillerin ortamda bulunmaları mikrovasküler hasarlanma için tek başına yeterli değildir. Bununla beraber endotele adezyon yapmaları lazımdır. Nötrofillerin endotele adezyonu sonucunda ortamda zedelenmeye neden olan ajanların konsantrasyonları yükselir. Nötrofillerin doku endoteline adezyon yapma özelliği iskemi reperfüzyon hasarı olan dokularda artmaktadır. Bu olaylar dizisi oksijen metabolitleri ve proteolitik enzim sentezinin artışından sorumludur(33).



Şekil 7. Lökosit endotel arasındaki etkileşim şeması(35)

İRH, vasküler hemostazı bozarak kompleman aktivasyonu ve bazı proinflamatuvar mediatörlerin salınmasına neden olur. Anafilotoksinler (C3a, C5a) ve membran attack kompleksleri(C5b-9) iskemi reperfüzyon hasarında önemli görevler üstlenirler. Proinflamatuvar mediatörlerden C5a, C3a'dan yaklaşık 20 kat daha aktiftir. Bunlara ek olarak C5a, lökosit aktivasyonunun ve kemotaksisinin stimülasyonu yoluyla; lökosit-monosit-kemoatraktan protein-1(MCP-1), TNF- α , IL-1, IL-6 gibi inflamatuvar ürünlerin artışı sağlar(36). iC3b, C3b'den oluşur. C5b-9 ve iC3b vasküler hemostazı değiştirebilir.

Vasküler endotelial- β 2 integrin, CD11-b ve CD18(MAC-1) lökosit adhezyonu için spesifik bir ligand görevi görürler. Bununla beraber C5b-9 kompleksi, endotelial hücrelerdeki nükleer faktör-kB (NFkB)'yi aktive ederek lökosit adhezyon moleküllerinin transkripsiyonunu ve ekspresyonunu artırır. VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin, P-Selektin gibi endotelial lökosit adhezyon molekülleri komplemandan etkilenir. C5b-9, endotelial IL-8 ve monosit kemoatraktan protein-1 salınımı yolu ile lökosit aktivasyonu ve kemotaksisini aktive ederler. Sonuç olarak; C5b-9 endotelial relaksasyon ve endotelial cGMP' yi azaltarak vasküler tonusta değişikliğe sebebiyet verirler. Kompleman aktivasyonu iskemik organlarda vasküler hemostazı değiştirip kan akımında değişikliklere ve lökositin endotele adhezyonun artmasına yol açabilir(36).

Endotel hücreleri İR hasarının oluşmasında önemli görev alırlar. Endotel hücrelerinin aktivasyonu ve işlevlerinde İRH sonucunda bozulma meydana gelir. Endotel hücreleri, SOR' un hedeflerinden biriyken diğer taraftan da SOR' ları kendi üretmeye başlar. Endotel hücreleri, endotelin(ET) ve Nitrik oksit(NO) üretir. Bu mikrovasküler homeostazdan sorumludur. NO, arteriyel dolaşımda ET'in vazokonstriktör etkisine zıt etki gösterir. Venlerde ise bunun tersi olmaktadır. Fakat İRH' da ET/NO oranı ET lehinde değişmektedir. Bunun sonucunda, arterlerde vazokonstriksiyon, venlerde ise vazodilatasyon oluşmaktadır(37). Endotel hücrelerinin İRH sonucunda kompleman sistemi aktive olur. Lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. Endotel hücreleri prostaglandinler (PG I₂, PG E₂), İL-1, PAF, GM-CSF, büyüme faktörleri, ET, NO ve Tx A₂'yi SOR etkisi sonucunda hasara cevap olarak üretirler. Endotel hücreleri aktive olduklarında ayrıca kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgırlar(38).

2.3. İntestinal İskemi Reperfüzyon Patofizyolojisi

İntestinal iskemi bir trombüs veya emboli ile arteriyel oklüziv sonucunda ortaya çıkarken, non oklüziv olarakta sıklıkla kalp yetmezliği, sepsis, adrenerjik ajanlar veya digitallerin uygulaması sonucunda da ortaya çıkmaktadır(39).

TÇ, SMA ve İMA' nın tıkanması sonucu meydana gelmektedir. Fakat her nasılsa mezenter arterler arasındaki kollateraller ve ek dolaşımlar bağırsaklara gelen kan akımını kompanse edebilirler. Sık olarak rastlanmamasına rağmen bazen mezenterik ven tıkanıklığının reperfüzyonu, arteriyel tıkanıklık kadar ciddi olabilir. Yapılan rat çalışmalarında, süperior mezenterik venin oklüzyonunun, SMA oklüzyonuna göre enerji metabolizmasını daha az azalttığı, fakat bağırsaklarda venöz oklüzyon sonucu ortaya çıkan hemoraji ve doku yaralanmasının geri dönüşümsüz olduğu tespit edilmiştir(40). İnsanlarda mezenterik ven trombozu, akut mezenterik iskemi ile birlikte hemorajik infarktla ve ciddi doku lezyonları ile sonuçlanmaktadır.

İnce bağırsakların mukozası, bağırsağı besleyen damarlar ile gelen kan akımının yaklaşık yarısını alırken, bağırsak duvar kalınlığının yarısını oluşturan muskularis propriya, toplam kan akımının %10-15'ini almaktadır. Bu nedenle ince bağırsakların mukoza ve

submukoza iskemiye daha duyarlıdır. Arteriyel tıkanmalarda, iskemi hattı komşu normal bağırsak dokusundan kesin bir sınırla ayrılırken, venöz oklüzyonda ise sınırlar belirgin değildir(41).

Arteriyel iskemi sonucunda dokuların O₂ desteği kesilince hücrede değişikliklere neden olmaktadır. Bunun sonucunda aerobik enerji metabolizması bozulur. İntraselüler ATP seviyelerinin azalmasına neden olarak hücrel hemostaz bozulur(30). İskemi süresi boyunca yetersiz O₂ desteği sonucunda mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun bozulması sonucu asit ve metabolitleri birikir. Bu direkt veya mediatörler aracılığıyla hücrel hasara neden olmaktadır. İskeminin ilerlemesi ile birlikte bu elementlerin birikmeleri ilerleyici hücrel hasara ve nekroza neden olmaktadır(42). Eğer iskemi nedeni bu geri dönüşümsüz değişikliklerden önce ortadan kaldırılırsa, hücrenin oksijenizasyonu sonucunda enerji metabolizmalarının yeniden kurulması, toksik ürünlerin atılması ve normal hücre fonksiyonlarının geri dönmesine neden olur(43).

İskeminin zamanına ve yoğunluğuna bağlı olarak dokulara O₂ yeniden verilmesiyle doku hasarı artabilir(oksijen paradoksu)(44). Parks ve Granger mezenter iskemilerde, reperfüzyon esnasında gelişen doku lezyonlarının iskemi esnasında gelişene göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir(27). İRH'da endotel ve farklı hücre yapıları arasındaki mikrovasküler hasar, hücrel nekroz veya apapitoza yol açan kompleks hücrel etkileşimleri tetikleyebilir.

Splanknik arterin oklüzyonu ve reperfüzyonu sonucunda vasküler permabilite artar, PMNL aktivasyonu ve adezyonu sonucunda proinflamatuvar maddelerin salınması, nitrojen derivelere ve oksijen derivesi SOR oluşmasıyla sirkulatuvar şok meydana gelebilir. Splanknik İR' nin başlattığı hasar, yoğun infiltratif infiltrasyonla karakterizedir ve baskın olarak mukoza ve submukozada birikerek endotelial hücre hasarına neden olur(45).

İİR, mukozal bariyerin bozulmasına, bakteriyel translokasyona, inflamatuvar yanıtlara ve asit baz değişikliğine neden olur. Bakteriyel translokasyon, bakterinin intestinal mukozadan mezenterik lenf nodlarına, buradan da diğer organ ve dokulara geçmesidir. Translokasyon süreci ilk olarak bakterinin bağırsak duvarına yapışması ile başlar ve bu tek başına sitokinlerinin üretilmesini başlatabilir. Bakterinin bir kere barsak duvarına yapışması sonucunda uzak organlara ulaşması kolaylaşır. Hipoksi, bağırsak duvarlarının fonksiyonunu kaybetmesine, böylece barsak permabilitesinin artmasına ve buna bağlı olarak toksik metabolitlerin salınmasını sağlar. Bu durum doku permabilitesinin daha da artmasına ve

bakteriyel translokasyonun kolaylaşmasına neden olur. İşaretlenmiş bakterilerin kullanıldığı bir çalışmada yirmidört saat sonraki kontrolün yarım saat sonraki kontrole göre daha doğru ipuçları vermesi, zamanın bakteriyel translokasyon ile ilgili kayda değer bir faktör olduğunu göstermektedir(46).

Doku kan perfüzyonunun geri dönmesi ile Ca^{+2} 'un hücre içerisine geçişi olur. Bunun sonucunda PL A₂ aktivasyonu artmaktadır. PL A₂' den salınan araşidonik asit reperfüzyon esnasında Prostaglandinleri (PG), Tromboksan, prostosiklinleri(PG I₂) üreten siklooksijenaz ve lökotrienleri üreten lipooksijenazlar tarafından metabolize edilir. Bu maddeler vazokonstriksiyona (TX A₂, LT C₄, LT D₄, LT E₄) , vazodilatasyona (PG I₂, PG E₁, PG E₂, PG D₂), artmış vasküler permabiliteye (LT C₄, LT D₄, LT E₄) platelet agregasyonuna ve PMNL kemotaksisine (LT B₄, HETE) neden olabilir(44).

Aydemir Köksoy ve arkadaşları intestinal iskemili tavşanlarda reperfüzyondan sonra platelet hızı ve yoğunluğunda bir azalma olduğunu göstermişlerdir(47).

Reperfüzyondan sonra intestinal doku hasarını indükleyen diğer bir neden ise mitokondrinin elektron transport zincirinden(ETS), XO metabolizmasından endotelial hücrelerden PG'lerden ve aktive nötrofillerden elde edilen oksijenden oluşan SOR oluşmaktadır(30).

Normal koşullar altında O₂ molekülü H₂O oluşturmak üzere mitekondrilerdeki sitokrom sisteminde tetravalan bir redüksiyona maruz kalırlar. Böylece oksijen derivesi olan SOR oluşur. Her nasılsa oksijenin % 1-2' si bu yolak dışına çıkar ve univalent bir redüksiyona maruz kalarak SOR oluşur. Normal koşullarda bu radikaller endojen antioksidan enzimlerle nötralize edilir. Fakat İR sırasında fazla miktarda SOR ortaya çıkar ve oksidatif stres diye bilinen bir sürece yol açarak zararlı etkilere neden olurlar(48).

İskemik periyotta ATP hipoksantin üretmek üzere katobolize edilir. Fizyolojik koşullar altında hipoksantin, XDH yolu ile ksantine okside olur. İskemi esnasında intraselüler alana Ca^{+2} birikimi olur ve XDH, XO'ya dönüşür. Bu reaksiyon intestinal dokuda diğer dokulara göre daha hızlıdır. Bu intestinal iskemi için, XO ölçümünü daha güvenli kılmaktadır. Bu enzimlerin en yüksek konsantrasyonu villus uçlarında tespit edilmiştir(49).

Reperfüzyon esnasında O₂ doku içerisine tekrar girer. Hipoksantin, XO ile reaksiyona girerek O_{2i} anyonu oluşur. Bu anyon SOD, katalaz(CAT), Glutasyon peroksidaz(GPx) ile reaksiyona girerek H₂O₂'ye dönüşür. Fe⁺² varlığında O_{2i} ve H₂O₂ yüksek derecede hücre için toksik ve reaktif olan OH_i oluşturmak üzere reaksiyona girerler.(Heber Weis ve Fenton

reaksiyonu) OH_i , hücre membranında lipid peroksidasyonunda rol oynar. Granülositlerin mikrovasküler endotele yapışmasını salgılayan komponentlerin salınımını sağlar. Yapışan granülositler, O_{2i} ve birkaç proteaz salgılayarak endotelial hücelere daha fazla zarar verirler(49).

O_{2i} iyonları NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur. Bu madde ise lipid peroksidasyonu, protein ve DNA modifikasyonunu arttırarak hücre hasarı meydana getirirler(45). Bütün hücrel komponentler SOR' a karşı çok hassastır. Çünkü SOR hücre membranında lipid peroksidasyonu yaparak membranın yapısında ve geçirgenliğinde değişikliğe neden olurlar.

Sonuç olarak, organellerde iyonik transformasyon ve içerik açısından selektivite kaybı olur ve sitotoksik ürünler birikir. Buna bağlı olarak hücre ölümü gerçekleşir(50). SOR, lipid peroksidasyonundan önce nötrofilleri aktive edebilir. İR üretilen kemoatraktörler (C5a İL-8 LTB4, PAF) tarafından, ayrıca inflamatuvar hüceler ve venöz endotelial hücelerin yüzeyinde bulunan çeşitli adezyon molekülleri selektinler, integrin b_2 (CD11ve 18) immunoglobulinler(ICAM- 1 VCAM-1 PECAM-1)(51).

Endotel aracılıklı migrasyon ve adezyondan sonra aktive olan nötrofiller daha fazla serbest radikale, proteolitik enzimler (kollejenaz, elastaz vb) ve peroksidaz salgılayarak lokal hasara neden olurlar. Aktif nötrofillerin akciğer ve diğer organlarca tutulumu multipl organ yetmezliği için önemli bir adımdır(51).

Normal rat bağırsağında ICAM- 1 ve VCAM -1' in İRH esnasında vasküler endotelden salınır. Bunun sonucunda, lökosit adezyonu artar ve lökositlerin bağırsağın hasarlı kısmına migrasyonunu kolaylaştırır. Mikrosirkülasyonun tıkanması kitlesel anlamda nötrofillerin adezyonuna bağlanır. Bu da geri dönüşümsüz fenomen olarak adlandırılır(52).

SOR' un üretilmesi sırasında NO önemlidir. NO, L- arginin' den üretilir ve indüklenebilen (iNOS) ve koruyucu (cNOS) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. NO, NO sentetaz tarafından üretilmesi İİR' de rol almaktadır. NO, her nasılsa ince bağırsakta İRH açısından koruyucu olabilir. NO, belki de düz kasları gevşettiği için vazodilatasyona faydalı olabilir fakat paradoksal olarak sitotoksik radikallerin üretilmesinde de rol alırlar(53).

Sekhon ve arkadaşları yaptıkları çalışmada NO' nun modülatör olarak faydalı olduğunu ancak oksidatif stres altında toksik bir potansiyele sahip olduğunu söylemektedirler(54).

Naito ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, ratlarda mezenterik İR ile indüklenen inflamasyonun NO' nun yüksek miktarda üretilmesi, artan iNOS ve lipid peroksidasyonu ekspresyonu ile karakterize oksidatif ve nitrosative bir stresle sonuçlandığını göstermiştir(55).

Doku iskemi ve reperfüzyonu proinflamatuvar genlerin üretilmesini sağlayan spesifik transkripsiyon faktörleri'ni [Protein aktivatör-1 (PA-1) ve (NF-kB)] birleştiren protein kinaz ailesini aktive eder. Sonuçta elde edilen ürünler, enzimler (iNOS, PL A₂, Siklooksijenaz), sitokinler (TNF-a, IL-1, IL-6) ve adezyon molekülleri (ICAM-1) dir. NF-kB sitoplazmada latent formda kalır. Bazı şartlar altında nukleusa transloke olur. Burası transkripsiyonu düzenlediği yerdir(56). Zou ve arkadaşlarına göre NF-kB, intestinal iskemi reperfüzyon lezyonlarının oluşmasında ve kaybolmasında önemli bir fonksiyon göstermektedir(57). NF-kB, sepsis, sitokinler ve oksidatif stres dahil proinflamatuvar sitümülyasyona bağlı olarak bağırsak tarafından aktive edilir. Aktive NF-kB inflamatuvar yanıtın artmasında ve sürdürülmesinde mediyatör sentezinde proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunun koordinasyonunda öncülük eder. NF-kB bu sebeple antiinflamatuvar tedavi için bir marker görevi görebilir. Kompleman sisteminin aktivasyonu NF-kB 'nin translokasyonuna ve iNOS ekspresyonunun artışına neden olabilir(56).

İRH' nin patofizyolojisinde, kompleman aktivasyonu önemli yer tutmaktadır. Kompleman sisteminin aktivasyonu, sadece nötrofillerin aktivasyonu tarafından sağlanmamaktadır. Ayrıca reperfüzyondan sonra SOD seviyelerinin azalması ile süperoksit anyonlarının artan üretimi de neden olabilir(56).

Komplemanın baskılanması veya inhibisyonu, İRH mediatörlerinin birçoğunu azaltabilir. Kompleman komponent 5 (C5), ICAM- 1, TNF- α ve IL-1a regülasyonu aracılığı ile intestinal lezyonları ölçer. Komplemanı bloke etmenin dokuları reperfüzyon hasarından koruduğunun bilinmesine karşın, hasar indüksiyonunun hücresel düzeyde moleküler mekanizmaları hala bilinmemektedir(52). Fleming ve ark. C5a'nın PMNL 'lerden bağımsız olarak ratlarda mezenter İR sonrası doku hasarını sınırlandırdığını göstermişlerdir(58).

Mastositler, kompleman aktivasyonundan sonra hasarı şiddetlendirebilirler. Mastositler ve bunlar tarafından indüklenen reaksiyonların İR esnasında mukozal permabilitenin artmasına katkıda bulunmakla birlikte, bunların patolojik hasardaki fonksiyonları hala bilinmemektedir. PMNL'lerin ve endotel hücrelerinin yanında diğer hücrelerinde İR hasarında kayda değer fonksiyonları olduğunu elde edilen kanıtlar ortaya koymaktadır(59).

Plateletler, lökositlere benzer olarak post iskemik reperfüzyon sırasında yuvarlanırlar ve damar endoteline sıkıca bağlanırlar. Platelet P-selektin, platelet lökosit etkileşimini düzenlerken, İR hasarında endotel hücresi ile platelet arası etkileşimi endotelial P-selektin düzenlemektedir(60). Bu iki hücre arasındaki etkileşimler, süperoksit üretilmesinde, lökositlerin fagositozunda ve adhezyon moleküllerinin artışında görevlidir.

İİRH' de rol oynayan bir diğer faktörde seratonindir. Seratonin, intestinal motilite, nörotransmisyon, platelet aktivasyonu ve vazodilatasyona katılan bir bioamindir. Teramoto ve arkadaşları, mezenterik iskemi reperfüzyondan sonra seratoninin plazma değerlerinin arttığını göstermiştir(61).

Son zamanlarda İR' den sonra Tripsin ve metaloproteinaz-9 (MMP-9) gibi inflamatuvar mediatörlerin üretiminde pankreatik proteazların dahil olduğu gösterilmiştir. MMP-9, çekirdeğinde çinko bulunan endopeptidazdır. Rosario ve arkadaşları, intestinal duvarda artmış nötrofil infiltrasyonu ile beraber lümen içi tripsinin inflamatuvar yanıtı arttırdığını göstermişlerdir(62).

İİRH' de platelet aktive edici faktör(PAF)'ün İR lezyonlarını arttırmada önemli bir fonksiyonu olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. PAF inflamatuvar yanıt için lipidik bir mediyatördür. İİRH' de mukozal apoptozusu arttırır. İRH' de PAF asetil hidrolaz (PAF-AH) aktivitesini inhibe eder ve buda PAF aktivitesini arttırır. PAF ise PECAM-1' in ekspresyonunu ve IL-6 sekresyonunu arttırır. Buda İİRH' de antiinflamatuvar fonksiyonları bulunan IL-10' un sentezini inhibe eder(63).

2.4. Antioksidan savunma mekanizması:

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemektedir. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak antioksidanlar denir (64)

Antioksidan savunma sistemi 4 yolla etki etmektedir.

- 1) SOR' u tutarak yok etme etkisi

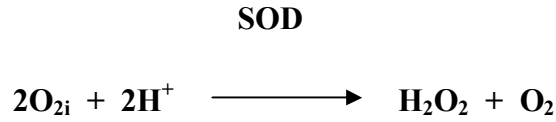
- 2) SOR' u inaktif hale dönüştürme etkisi
- 3) SOR' u bağlamak suretiyle zincir kırıcı etkisi
- 4) SOR' un oluşturduğu hasarı onarıcı etki

2.4.1. Endojen Antioksidanlar

2.4.1.1. Enzim olan endojen Antioksidanlar

2.4.1.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, O₂ tüketen tüm organizmalarda bulunan bir metalloproteindir ve substratı olan O_{2i}, H₂O₂ ve moleküler O₂ dönüşümünü katalize eder. Bu reaksiyon SOD ile katalizlendiğinde reaksiyon hızı 4000 kat kadar artmaktadır.



İnsanlarda SOD'un üç tipi bulunur:

SOD-1; Cu-Zn SOD: Sitoplazmada bulunmaktadır.

SOD-2; Mn-SOD: Mitokondride bulunmaktadır

SOD-3; ES-SOD: Ekstrasellüler sıvıda bulunur. Heparin ve heparin sülfat gibi glikozaminoglikanlara yüksek affinite göstermektedir(65).

SOD aktivitesi oksijen kullanımı artmış olan dokularda yüksektir. Normal metabolizma sırasında SOD sayesinde hücreler tarafından O_{2i} anyonu üretimi artmasına rağmen intrasellüler O_{2i} seviyesi düşürülmektedir. SOD enziminin ekstraselüler aktivitesi oldukça düşüktür(66). SOD, fagosite edilmiş bakterilerin hücre içinde öldürülmesinde görevlidir. DNA'yı özellikle radyasyonun iyonizan etkisine karşı koruyarak hücreyi savunmaktadır(67).

2.4.1.1.2. Katalaz (CAT)

Glikoprotein yapısında 4 hem grubu içeren, bilinen en hızlı enzimlerden biridir ve hücre içerisinde peroksizomlarda yoğun olarak bulunmaktadır. Görevi ise; H₂O₂' ti O₂ ve H₂O' ya dönüştürmektedir. Toksik olan hidroksil radikallerinin oluşmasını bu yolla önlemektedir(68).



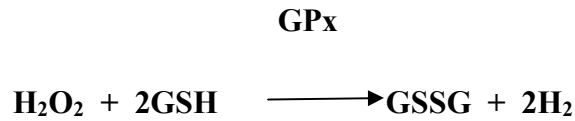
2.4.1.1.3. Glutatyon peroksidaz (GPx) ve Glutatyon redüktaz (GRx)

GPx, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. GPx; tetramerik, dört adet selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirgemekle görevlidir.

GPx'in H₂O₂' ye bağlı hücre hasarında, CAT' dan daha fazla hücreyi koruyucu etkisi vardır. E vitamini gibi sitozolde bulunan glutatyona bağlı enzimler lipid peroksidasyonunu engeller. GPx, peroksidasyon ürünlerinin detoksifikasyonunu yağ açıl hidroksiperoksidlerin alkole bağlanmasını azaltarak sağlamaktadır. GPx' in antioksidan aktivitesini göstermesi için hücre içinde yeterli konsantrasyonda GRx, glutatyon ve NADPH bulunması şarttır(69).

Hidroperoksitlerin redükte olmasıyla meydana gelen GSSG, GRx'ın katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH' ye dönüşür(70).

Solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini GPx engellemektedir. GPx, eritrositlerde oksidan strese karşı antioksidan özellik gösterir. GPx aktivitesinde azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarının şiddetini arttırır(70).



2.4.1.1.4. Hidroperoksidaz

2.4.1.2. Enzim olmayan endojen antioksidanlar:

- Melatonin
- Seruloplazmin
- Transferrin
- Miyoglobilin
- Hemoglobin
- Ferritin
- Bilirubin
- Sistein
- Metiyonin
- Ürat
- Laktoferrin
- Albumin

2.4.2. Eksojen olan Antioksidanlar:

- Vitamin E
- Vitamin C
- Folik Asit
- Sitokinler
- Barbitüratlar
- Demir Şelatörleri
- Dessferroksamin
- Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar
- Kalsiyum Kanal Blokerleri
- Lokal Anestezikler
- Allopürinol
- Adenozin
- Mannitol
- Sistein/Asetilsistein

2.5 Propolis:

Günümüzde önemi giderek artan ve doğal bir ürün olan propolis; bitki ve ağaçların yaprak ve sürgünlerinden bal arıları tarafından toplanan, reçine içeren karışık bir maddedir. Propolisin yapımı için arılar tarafından kullanılan maddeler; bitkilerin yara bölgelerinden salgılanan maddeler olabildiği gibi, yapraklardaki lipofilik materyaller ile reçine, müsilaj, zambak gibi maddeler de olabilmektedir. Arılar bu salgıya daha sonra polen kaynaklı maddeler ile çeşitli enzimler de eklemektedirler(71).

Bal arıları, propolisi kovan duvarlarındaki çatlakların kapatılmasında, bal petek yapımında, kovan girişinin küçültülmesinde gibi görevlerde kullanmak üzere üretirler. Propolis; bakteri, mantar ve virüslere karşı etkili olması nedeniyle, kovadaki tüm arı popülasyonu için, çeşitli enfeksiyonlara karşı koruyucu etkisi bulunmaktadır(71).

Çok eski zamanlardan beri propolisin tıbbi özellikleri bilinmektedir. Propolis, insanlar tarafından yıllar boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde denenmiştir. Flavonoidler, propolisin önemli bir içeriğidir. Flavonoidlerin; antitümoral, hepatoprotektif, vasküloprotektif, antiinflamatuvar, antioksidan, serbest radikal temizleyici, antiülser, intestinal motilite ve sekresyon inhibisyonu, antiosteoprotik, antiallerjik, antimikrobiyal ve immünomodülatuar gibi çeşitli özellikleri tespit edilmiştir(9).

Propolislerin antimikrobiyal aktivitesinin, genellikle pinosembrin(PC), galangin ve pinobanksin gibi flavonoidlerce olduğu tespit edilmiştir. Propolisin yapısında bulunan PC' nin antifungal aktiviteye sahip olduğu, prenil para-kumarik ve diterpenik asitlerin antibakteriyel ve tümör hücrelerine sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Kafeik asit fenetil esterlerinin tümör hücreleri için sitotoksik olduğu gösterilmiştir(71).

Russo ve ark. propolisin güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğunu gösterdiler(72).

İn vivo şartlarda yapılan bir çalışmada, propolisin tavşanlarda böbrek düzeyinin altında aort tıkanmasından sonra oluşan iskemik omurilik hasarını engellediğini göstermiştir.(73) Bu sonuçlarla propolis ve onun aktif bileşeni kafeik asit fenetil esterinin profilaktik kullanımının torasik veya torakoabdominal aort anevrizmasının cerrahi düzeltilmesi sırasındaki omurilik hasarını azaltacağını desteklemektedir. Propolisin insan nörofibromatozisinin büyümesini azalttığı tespit edilmiştir(74). Ayrıca yapılan diğer bir

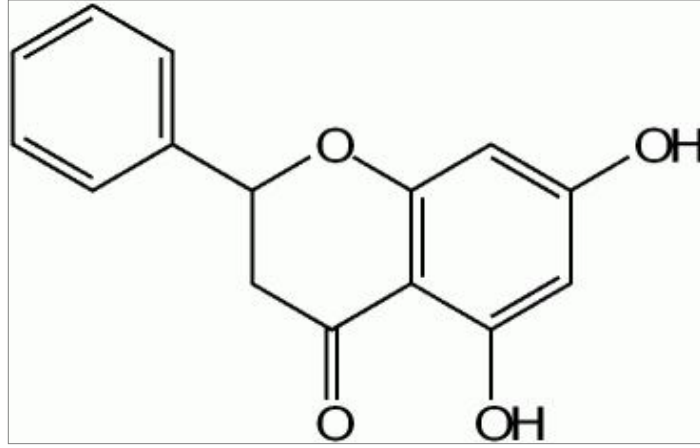
çalışmada da, insan hepatosellüler karsinoma hücrelerinin invazyonunu engellediği gösterilmiştir(75).

Akut ve kronik hadiselerde propolisin anti-inflamatuvar etkinliği olduğu gösterilmiştir. Propolisin antiinflamatuvar etki mekanizması; prostoglandinlerin sentezini inhibe ederek, timus bezini aktive ederek, fagositik aktiviteyi arttırarak, hücrel bağışıklığı stimüle ederek ve epitelyal dokuların iyileşmesini arttırmak suretiyle göstermektedir(76). Propolis inflamasyonda, nötrofiller tarafından meydana getirilen serbest radikalleri yakalar(77). Ayrıca lipooksijenaz ve siklooksijenaz sentezini inhibe eder(78).

Propolisin farmakolojik etkinliği dört farklı mekanizmayla ortaya çıkar. Bunlar; serbest radikalleri yakalama kabiliyeti, biyolojik polimerlere ve ağır metal iyonlarına bağlanması, elektron taşınma hızının arttırılmasıdır. Propolis bu özellikleri nedeniyle; antimikrobiyal, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar, antikanser, antioksidan, antiülseratif, immünostimulan ve lokal anestetik etkiler göstermektedirler. Propolis içinde bulunan etkili antioksidanın flavonoidler olduğu söylenmektedir(79). Propolisin içerisinde bulunan diğer bileşiklerinin de antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir(80).

2.6. Pinocembrin (PC):

PC (5,7-dihydroxyflavanone) propoliste en yüksek konstrasyonda bulunan flavonoidlerden biridir. Pinocembrin antimikrobiyal, vasorelaksatif, antioksidan, antifungal antiinflamatuvar ve antiapoptotik gibi çoklu biyolojik etkileri olduğu söylenmektedir(81).



Şekil 8: Pinocembrin kimyasal yapısı

Eş anlamlısı: Dihydrochrysin

Galangin flavanone

Moleküler Formülü: C₁₅H₁₂O₄

Moleküler Ağırlığı: 256. 25 g/mol

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Yerel Etik Kurulu onayı (Hr. Ü. Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 18.02.2010 tarih ve B.30.HRÜn.0.05.07.00/270-40 sayılı onay kararı) alındıktan sonra, Çevre ve Orman Bakanlığı tarafından Resmi Gazete'nin 6 Temmuz 2006 tarih ve 2622 sayılı nüshasında yayımlanan Hayvan Deneyleri Etik kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına dair Yönetmelik ile Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1 Çalışma gruplarının oluşturulması

Ratlar çalışma öncesinde oda sıcaklığında 12 saat ışık ve 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Çalışmamızda ağırlıkları 180-240 gr arasında olan 30 adet Wistar-Albino rat kullanıldı. Tüm ratlar standart koşullar altında şebeke suyu ve standart rat yemi ile beslendi. Girişimden 8 saat önce tüm ratların beslenmesi kesildi. Ratlar; opere sham grubu, İskemi/Reperfüzyon grubu (kontrol grubu), ve İskemi/Reperfüzyon (İ/R)+Pinocembrine (PC) Grubu (PC grubu) olarak 3 gruba ayrıldı.

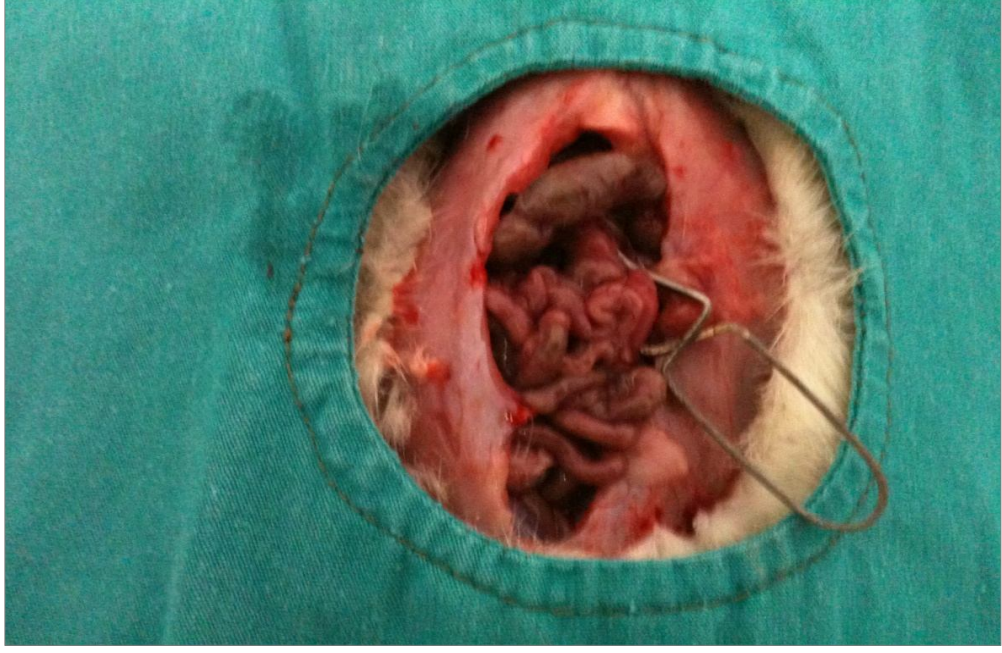
Ratların anesteziğinde Ketamin(Ketalar; Parke Davis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve Xylazine(Rompun; Bayer AG, Leverkusen Germany) kombine kullanıldı. Ketamin 87 mg/Kg intraperitoneal olarak ve Xylazine 13 mg/kg dozlarında yapıldı. Ratlara uygun pozisyon verildi.(Resim-1) Ratların karın bölgesi dezenfekte edildikten sonra orta hat insizyonla laparotomi yapıldı. Sham grubuna laparotomi dışında işlem yapılmadı. Diğer 2 grupta intestinal yapılar retrakte edildikten sonra SMA aorta' dan çıktığı yerden bulunarak mikrovasküler Bulldog klemp ile kapatıldı.(Resim-2) Altmış dakika iskemi yapıldıktan sonra klempler açılarak 60 dakika reperfüzyon sağlandı.(Resim-3) Kontrol grubuna herhangi başka bir işlem yapılmadı. PC tedavi grubuna iskemiden hemen önce ve reperfüzyondan hemen sonra 5 mg/kg intraperitoneal olarak PC verildi.



Resim 1. Ratlara uygun pozisyon verilmesi ve tesbiti



Resim 2. SMA' nın ortaya konulması ve klemplenmesi



Resim 3. İntestinal iskemi oluşturulması

İşlem süresince ek doz anesteziiye ihtiyaç duyulmadı. İşlemin sonunda tüm ratlardan bağırsak dokusu ve kan örnekleme yapıldı.

Bağırsak dokuları %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde konarak patoloji laboratuvarına gönderildi. Hazırlanan parafin kesitlerden 5 mikron kalınlığında kesitler elde edildi. Bu kesitler deparafinizasyon işleminden sonra histopatolojik inceleme için Hematoksilen-Eozin(HE) boyası ile boyandı.

Ratlardan alınan kan örnekleri santrifüj edilerek ve elde edilen serumlar çalışılmak üzere Biyokimya laboratuvarında -80 °C derin dondurucuda saklandı. Aynı ratlardan elde edilen doku örnekleri de -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.2 Dokuların homojenizasyonu

Doku örneklerinin analizinden önce, bütün doku örnekleri tartıldı ve boş çalışma tüplerine yerleştirildi. Daha sonra boş tüplerde bulunan doku örnekleri üzerine her bir gram doku için, dilüsyon 1:10 olacak şekilde 140 mM KCl solüsyonu eklendi. Daha sonra bütün dokular mekanik karıştırıcıda homojenize edildi. Homojenat 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj

edildi. Santrifüj sonrası süpernatantın Toplam oksidatif seviyesi (TOS), Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), Prolidaz enzim aktivitesi ve diğer klinik testlerin ölçümü yapıldı. Sonuçlar gram protein cinsinden verildi (82).

3.3 Total Antioksidan Seviye(TAS)

Örneklerin total antioksidan seviye(TAS) düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikal antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilir(83). Dokulardaki TAS sonuçları Trolox Equivalent/gram protein olarak ifade edildi.

3.4 Total Oksidan Seviye(TOS)

Örneklerin toplam oksidan status(TOS) düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyona kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanılır. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L olarak ifade edilir(84). Dokulardaki TOS sonuçları $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/gram protein olarak ifade edildi.

3.5 Oksidatif Stres İndeksi(OSİ)

Örneklerin Oksidatif Stres İndeksi(OSİ) hesaplanırken TAS değerleri 10 ile çarpılarak TOS ile birimler eşitlenir. Örneklerin içerdiği Toplam Oksidan Seviye (TOS) düzeylerinin, örneklerin içerdiği Toplam Antioksidan Seviye (TAS) oranı Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) olarak belirtildi (85). Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

$$\text{OSİ} = \frac{(\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.})}{(\text{TAS, } \mu\text{mol trolox Equiv. / L.}) \times 10}$$

3.6 Prolidaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

Plazma/Serum Prolidaz enzim aktivitesi ölçümü Modifiye Chinard metodu ile manuel olarak ölçüldü. Yöntemin prensibi glisil-prolin substratının prolidaz enzimi aracılığı ile oluşan prolinin asidik ortamda ısı etkisiyle ninhidrin ile renkli bir bileşik oluşturma ilkesine dayanır. Rengin şiddeti prolin konsantrasyonuna bağlıdır ve oluşan prolinin absorbanansı 515 nm'de ölçülerek enzim aktivitesi U/L olarak tanımlanmıştır (86).

3.7 Katalaz(CAT) aktivite ölçümü

H₂O₂ ile inkübe edilen ve amonyum molibdat eklenerek enzim reaksiyonları durdurulan serum CAT aktivitesi Goth tarafından tariflenen kolorimetrik bir yöntemle tesbit edildi(87). Serum CAT aktivitesi kU / L olarak ifade edildi

3.8 Myeloperoksidaz(MPO)'ın belirlenmesi

WBC içinde bulunan, lizozomal oksidatif bir enzim olan doku MPO aktivite ölçümü, Wei ve Frenkel tarafından tariflenen metodla yapıldı ve veriler U/g protein olarak belirlendi(88).

3.9 Aspartat Aminotransferaz (AST)

Örneklerin içerdiği AST düzeyi Roche marka COBAS INTEGRA 800 otoanalizöründe Roche marka AST kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Testin prensibi transaminasyon reaksiyonunda gerçekleşen NADH yükseltgenmesinin hızı katalitik AST

aktivitesiyle doğru orantılıdır. Absorbanstaki azalma 340 nm’de ölçülerek tayin edilir. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi.

3.10 Alanin Aminotransferaz (ALT)

Örneklerin içerdiği AST düzeyi Roche marka COBAS INTEGRA 800 otoanalizöründe Roche marka ALT kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Testin prensibi transaminasyon reaksiyonunda gerçekleşen NADH yükseltgenmesinin hızı katalitik ALT aktivitesiyle doğru orantılıdır. Absorbanstaki azalma 340 nm’de ölçülerek tayin edilir. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi.

3.11 Laktat Dehidrogenaz(LDH)

Örneklerin içerdiği LDH düzeyi Roche marka COBAS INTEGRA 800 otoanalizöründe Roche marka LDH kitleri kullanılarak ölçülmüştür. LDH, L-laktatın pirüvata dönüşümünü katalize eder. İşlem sırasında NAD^+ NADH’ ye indirgenir. NADH oluşumunun başlangıç hızı katalitik LDH aktivitesiyle doğru orantılıdır. Absorbanstaki artış 340 nm’de ölçülerek tayin edilir. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi

Doku örnekleri fosfat tamponu ile homojenize edildi, kan örnekleri ise çözülerek homojen hale gelmesi sağlandı. Doku ve serum numuneleri biyokimya laboratuvarında prolidaz enzim Aktivitesi düzeyi, miyeloperoksidaz enzim aktivite düzeyi, katalaz enzim Aktivite düzeyi manuel olarak, total antioksidan kapasite (TAS) ve total oksidatif seviye (TOS) parametreleri ise Abbot Aeroset marka oto analizör cihazında Erel tarafından geliştirilen Rel Assay ticari kitleri ile çalışıldı. Doku örneklerinde ayrıca Lowry Metodu ile mikroprotein düzeyleri ölçüldü. Doku örneklerinde sonuçlar gr protein cinsinden verildi. Kontrol ve çalışma grubunun serum ve doku verileri Statistical Package for the Social Sciences(SPSS) for Windows, version 20(SPSS Inc. Chicago, IL. USA) de karşılaştırılarak değerlendirildi.

Alınan doku örnekleri Patoloji bölümümüzde histopatolojik olarak incelendi.

3.12 İstatistiksel Analiz

İstatistik analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows, version 20 (SPSS Inc. Chicago, IL. USA) programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama \pm standard sapma olarak sunuldu. Her üç grupta da parametreler normal dağıldığı için grupların karşılaştırılmasında “Independent Samples t-test” kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular:

Kan ve doku örnekleri biyokimyasal olarak çalışıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Öncelikle İRH oluşup oluşmadığını değerlendirmek üzere sham ve kontrol grubu karşılaştırıldı. Sonrasında PC tedavi grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldı.

Plazma örneklerinde, AST, ALT ve LDH seviyeleri kontrol grubunda, sham grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu. Bu sonuçlar (**Tablo 1**) de gösterilmiştir. (Sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$ ve $p<0.05$).

Plazma MPO ve prolidaz değerlerinde kontrol grubunda sham grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artış tesbit edildi($p<0.05$, $p<0.05$). Plazma TOS, OSİ değerlerinde kontrol grubunda sham grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artış mevcuttu($p<0.05$, $p<0.05$). Plazma CAT değerlerinde kontrol grubunda sham grubuna oranla anlamlı bir düşüş tesbit edildi($p<0.05$). Plazma TAS değerleri kontrol grubu ile sham grubun arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p>0.05$). Bu sonuçlar (**Tablo 1**) de gösterilmiştir.

Doku örneklerindeki AST, ALT ve LDH seviyeleri kontrol grubunda, sham grubuna oranla anlamlı derecede artmış olarak bulundu(Sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$ ve $P<0.05$). Bu sonuçlar (**Tablo 2**) de gösterilmiştir.

Doku örneklerinde, TOS, OSİ, MPO ve Prolidaz değerlerinde kontrol grubunda, sham grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artış tespit edildi(sırasıyla $P<0.05$, $p<0.05$, $p<.05$, $p<0.05$). Doku örneklerinde, CAT değerlerinde kontrol grubunda, sham grubuna oranla anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir($p<0.05$,). Doku örneklerinde, TAS değerlerinde, kontrol grubuyla sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi($p>0.05$). Bu sonuçlar (**Tablo 2**) de gösterilmiştir.

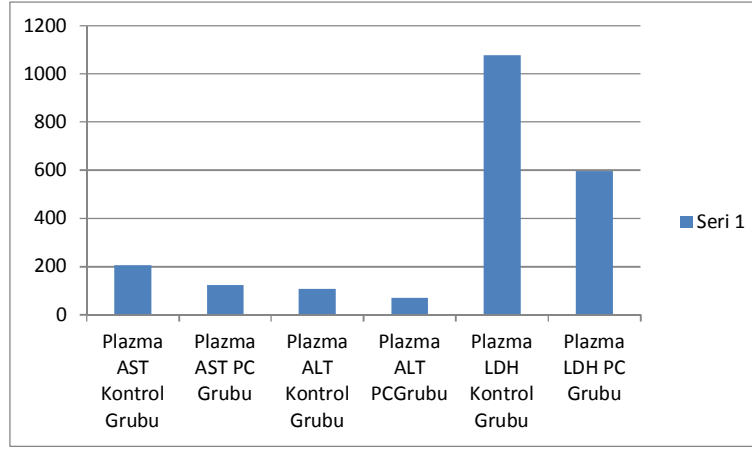
Plazma	Grup	N	Ortalama	Std. Deviasyon	Std. Hata
TAS	Sham	10	,9535	,17463	,05522
	Kontrol	10	,9260	,11439	,03617
TOS	Sham	10	46,9250	16,73128	5,29090
	Kontrol	10	80,8330	13,53582	4,28040
CAT	Sham	10	17,0454	2,70315	,85481
	Kontrol	10	13,9973	1,89613	,59961
MPO	Sham	10	53,1432	17,80478	5,63036
	Kontrol	10	72,0190	11,81373	3,73583
PROLİDAZ	Sham	10	768,3347	67,90765	21,47428
	Kontrol	10	890,6189	106,90736	33,80707
OSİ	Sham	10	4,9846	1,73819	,54966
	Kontrol	10	8,7947	1,56991	,49645
AST	Sham	10	104,6000	19,41477	6,13949
	Kontrol	10	207,2000	101,75439	32,17756
ALT	Sham	10	59,7000	11,70043	3,70000
	Kontrol	10	107,5000	39,74432	12,56826
LDH	Sham	10	577,4300	163,72392	51,77405
	Kontrol	10	1078,3100	430,40655	136,10650

Tablo 1. Sham ve kontrol gruplarında plazma parametrelerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri

Doku	Grup	N	Ortalama	Std. Deviasyon	Std. Hata
TAS	Sham	10	,1557	,06414	,02028
	Kontrol	10	,1549	,05017	,01587
TOS	Sham	10	5,3303	1,35524	,42856
	Kontrol	10	10,0319	2,00468	,63394
CAT	Sham	10	4,9899	1,40811	,44528
	Kontrol	10	3,4726	1,47164	,46537
MPO	Sham	10	5,0416	2,01881	,63840
	Kontrol	10	11,0663	3,03144	,95863
PROLİDAZ	Sham	10	130,6621	23,41615	7,40484
	Kontrol	10	190,1880	27,96021	8,84179
OSİ	Sham	10	4,0294	2,06213	,65210
	Kontrol	10	6,9991	2,23287	,70610
AST	Sham	10	2382,4000	658,02975	208,08728
	Kontrol	10	3148,5000	791,52318	250,30161
ALT	Sham	10	761,2000	599,46695	189,56809
	Kontrol	10	2167,8000	720,98556	227,99565
LDH	Sham	10	9491,1100	3710,58764	1173,39084
	Kontrol	10	19142,8900	5040,72506	1594,01722

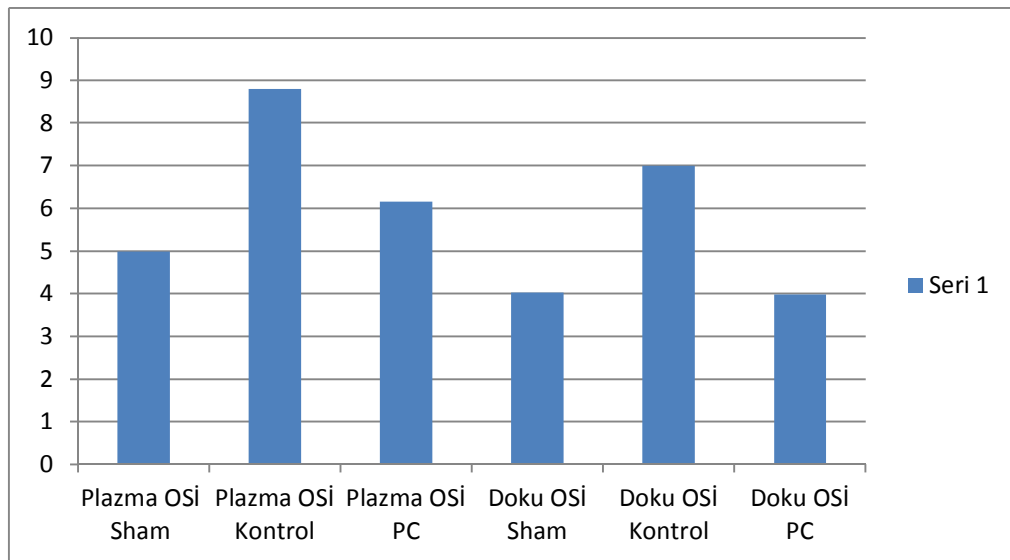
Tablo 2. Sham ve kontrol gruplarında doku parametrelerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.

Plazma ALT, AST ve LDH seviyeleri, PC grubunda, kontrol grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulundu.(Sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$ ve $p<0.05$). Bu sonuçlar (**Tablo 3**) de gösterilmiştir.



Grafik 1: Kontrol ve PC grubunda plazma AST, ALT, LDH değerlerinin karşılaştırılması

Plazma TAS değerlerinde, PC grubunda, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç tespit edilememiştir ($p>0.05$). Plazma TOS ve OSİ değerlerinde PC grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşme mevcuttu ($p<0.05$, $p<0.05$). Plazma CAT değerlerinde, PC grubunda, kontrol grubuna oranla anlamlı derecede artış tespit edildi ($p<0.05$). Plazma MPO değerlerinde, PC tedavi grubunda, kontrol grubuna oranla anlamlı bir düşme tespit edildi ($p<0.05$). Plazma Prolidaz değerlerinde, PC tedavi grubunda, kontrol grubuna oranla anlamlı derecede düşüş tespit edildi ($p<0.05$). Bu sonuçlar (**Tablo 3**) de gösterilmiştir.

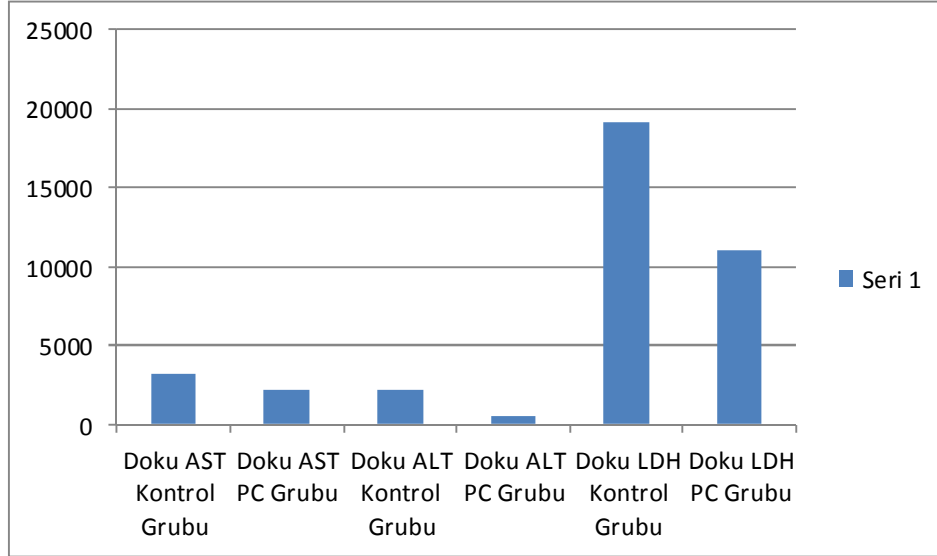


Grafik 2: Tüm gruplardaki plazma ve doku OSİ değerlerinin karşılaştırılması

Plazma	Grup	N	Ortalama	Std. Deviasyon	Std. Hata
TAS	Kontrol	10	,9260	,11439	,03617
	PC	10	1,0488	,25169	,07959
TOS	Kontrol	10	80,8330	13,53582	4,28040
	PC	10	62,4990	18,87324	5,96824
CAT	Kontrol	10	13,9973	1,89613	,59961
	PC	10	16,3097	2,08684	,65992
MPO	Kontrol	10	72,0190	11,81373	3,73583
	PC	10	47,5957	17,31476	5,47541
PROLİDAZ	Kontrol	10	890,6189	106,90736	33,80707
	PC	10	762,5566	99,07352	31,32980
OSİ	Kontrol	10	8,7947	1,56991	,49645
	PC	10	6,1598	2,04232	,64584
AST	Kontrol	10	207,2000	101,75439	32,17756
	PC	10	123,5000	45,36335	14,34515
ALT	Kontrol	10	107,5000	39,74432	12,56826
	PC	10	71,5000	29,67696	9,38468
LDH	Kontrol	10	1078,3100	430,40655	136,10650
	PC	10	595,0600	155,56116	49,19276

Tablo 3. Kontrol ve PC gruplarında plazma parametrelerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.

Doku örneklerinde, AST, ALT ve LDH seviyeleri PC grubunda, kontrol grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulundu(Sırasıyla $p<0.05$, $p<0.05$ ve $p<0.05$). Bu sonuçlar (Tablo 4) de özetlenmiştir.



Grafik 3: Kontrol ve PC gruplarında doku AST, ALT ve LDH değerlerinin karşılaştırılması

Doku örneklerinde MPO değerlerinde PC grubunda, kontrol grubuna oranla anlamlı derecede düşme tespit edilmiştir($p<0.05$). Doku örneklerinde, TAS değerleri açısından PC ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir($p>0.05$). Doku örneklerinde, Prolidaz değerlerinde PC grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşme tespit edilmiştir($p<0.05$). Doku örneklerinde, TOS ve OSİ değerlerinde anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir($p<0.05$, $p<0.05$). Doku örneklerinde, CAT değerinde PC grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma tespit edilmiştir($p<0.05$). Bu sonuçlar (Tablo 4) de gösterilmiştir.

Doku	Grup	N	Ortalama	Std. Deviasyon	Std. Hata
TAS	Kontrol	10	,1549	,05017	,01587
	PC	10	,1746	,04448	,01407
TOS	Kontrol	10	10,0319	2,00468	,63394
	PC	10	6,0407	2,00081	,63271
CAT	Kontrol	10	3,4726	1,47164	,46537
	PC	10	5,0561	1,36209	,43073
MPO	Kontrol	10	11,0663	3,03144	,95863
	PC	10	8,7054	1,85282	,58591
PROLİDAZ	Kontrol	10	190,1880	27,96021	8,84179
	PC	10	147,0399	25,21230	7,97283
OSİ	Kontrol	10	6,9991	2,23287	,70610
	PC	10	3,9761	2,77572	,87776
AST	Kontrol	10	3148,5000	791,52318	250,30161
	PC	10	2152,8000	392,09829	123,99237
ALT	Kontrol	10	2167,8000	720,98556	227,99565
	PC	10	536,3000	344,30156	108,87771
LDH	Kontrol	10	19142,8900	5040,72506	1594,01722
	PC	10	11070,8400	1610,80329	509,38072

Tablo 4. Kontrol ve PC gruplarında doku parametrelerinin ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri.

4.2 Histopatolojik Bulgular:

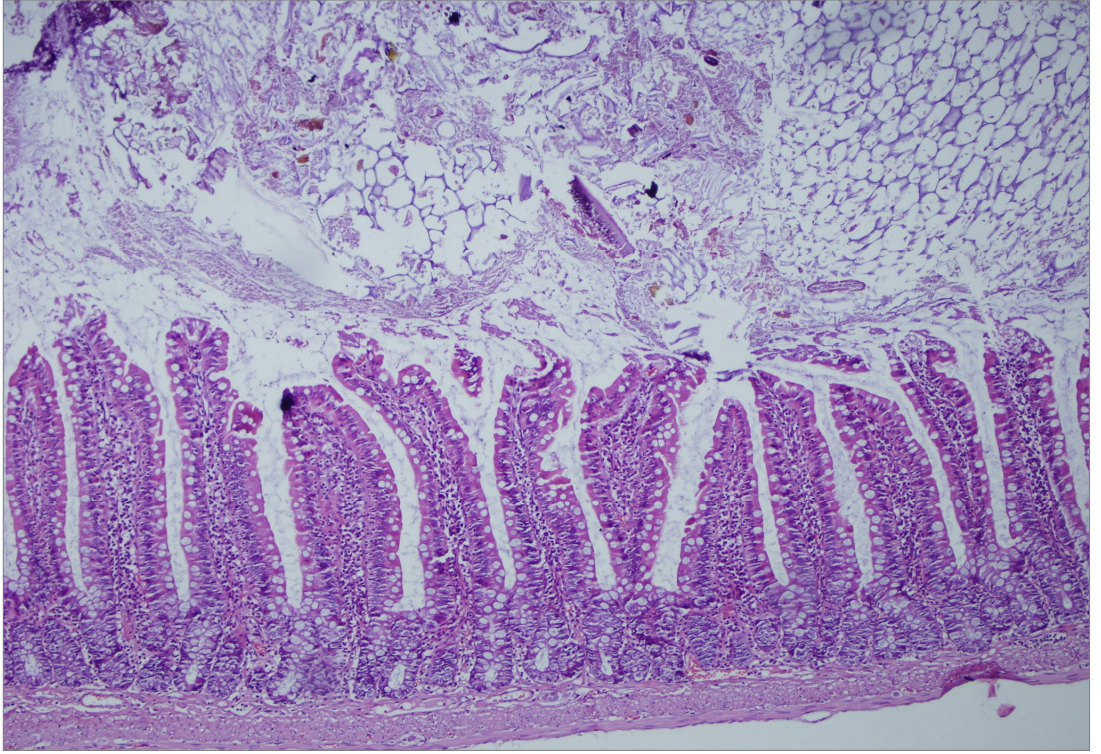
Bağırsak doku örnekleri %10' luk formalin solüsyonu içerisinde patoloji bölümüne gönderildi. Rutin doku takibi sonrası elde edilen parafin bloklardan 5 mikronmetrelik kesitler lam üzerine alınarak, HE ile boyanarak mikroskopik inceleme yapıldı. Örneklerde, bağırsak dokusundaki değişiklikler Chui ve ark önerdiği yöntemle göre semikantitatif olarak skorlandı(89) .

Tablo 5. Chiu'nun histopatolojik hasar skorlaması (89)

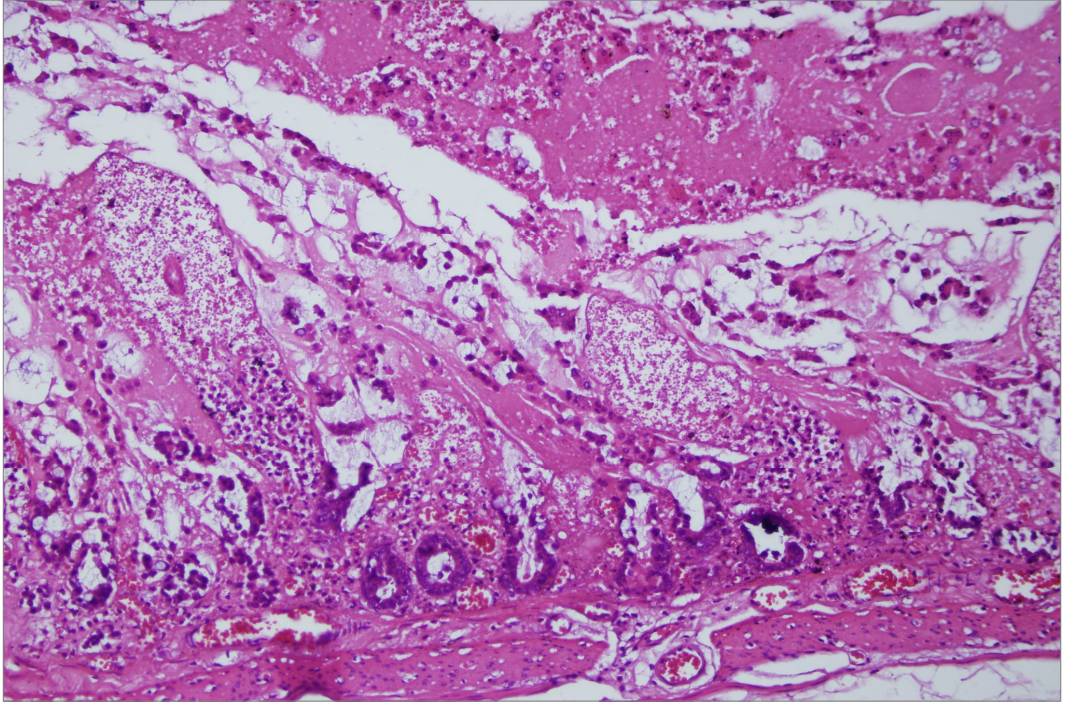
Evre 0	Normal villus
Evre 1	Subepitelyal alanın gelişmesi, genellikle villusların apeksinde kapiller konjesyon
Evre 2	Subepitelyal alanın genişlemesi ve epitelyal tabakanın lamina propia'dan orta derece ayrışması
Evre 3	Villusların alt kısımlarının lamina propriadan ileri derecede epitelyal ayrışması
Evre 4	Villusların soyulması, kapiller dilatasyon, lamina proprianın geçirgenliğinde artma
Evre 5	Lamina propriada parçalanma, hemoraji ve ülserasyon

Tablo 6. Gruplardaki deneklerin Chiu sınıflamasına göre dağılımları

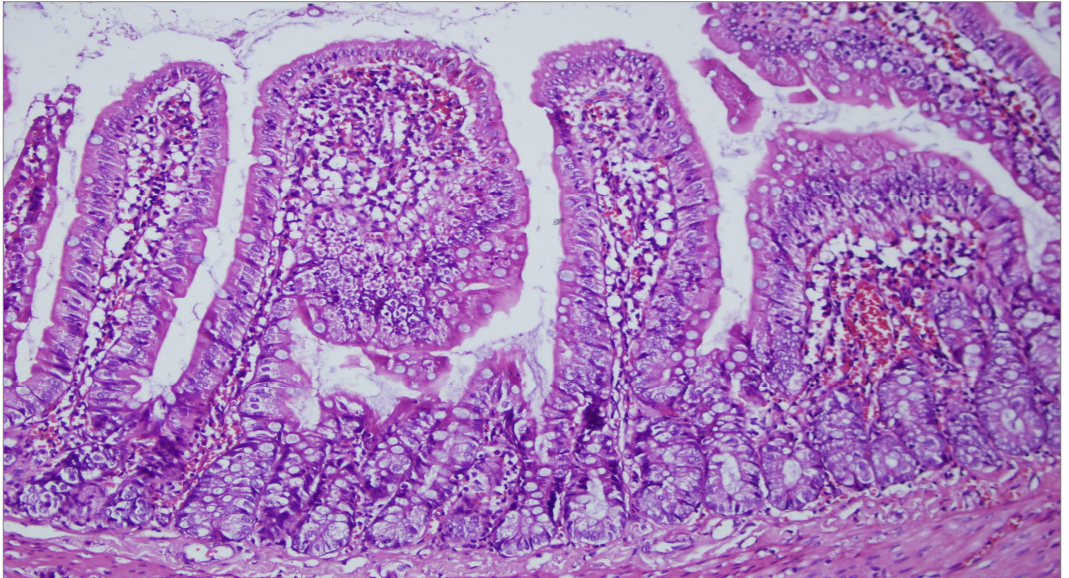
GRUPLAR	Evre 0	Evre1	Evre 2	Evre 3	Evre 4	Evre 5	Toplam
Sham	10	-	-	-	-	-	10
Kontrol	1	1	3	3	-	2	10
PC	4	3	2	1	-	-	10



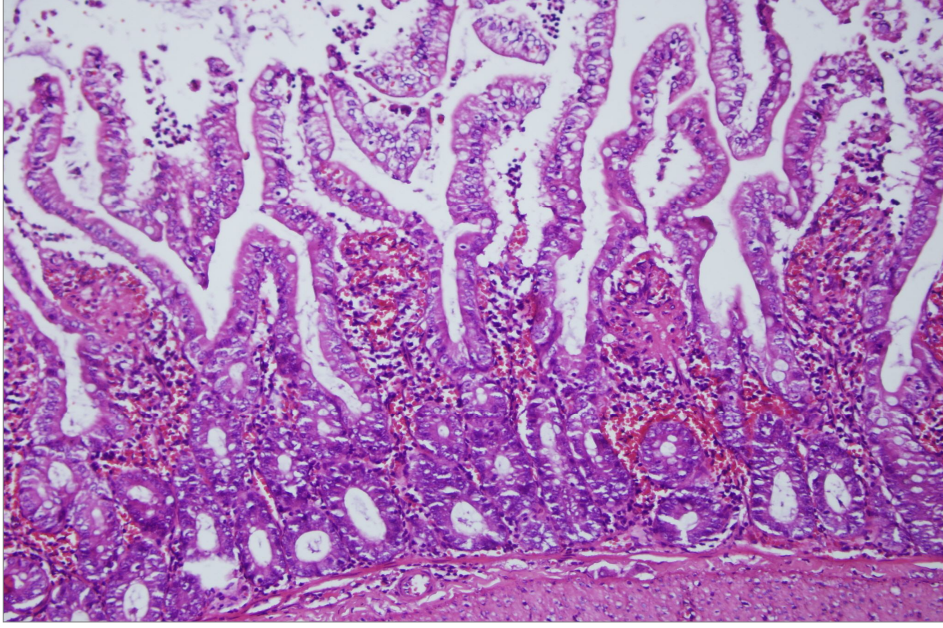
Resim 4. Normal barsak mukozası izlenmektedir (Evre 0) (H&E x100)



Resim 5. Kontrol grubundaki örnekte, lamina propiada parçalanma ülserasyon ve hemoraji izlenmektedir (Evre 5) (H&E x200).



Resim 6. PC grubundaki örnekte villuslarda kapiller konjesyon ve ödem izlenmektedir.(Evre 1) (H&E x200).



Resim 7. PC grubundaki örnekte epitelyal tabakanın lamina propiadan ayrıştığı izlenmektedir (Evre 2) (H&E x200).

Histopatolojik incelemede, kontrol grubunda, 10 denekten hiç birinde iskemi bulguları görülmedi. Villus yapısı tamamen normal görünümdeydi. Kontrol grubundaki deneklerin birinde evre 0, birinde evre 1, 3 tanesinde evre 2, üçünde evre 3 ve 2 tanesinde evre 5 histopatolojik değişiklikler görüldü. PC grubundaki deneklerin dördünde evre 0, üçünde evre 1, ikisinde evre 2 ve bir tanesinde evre 3 olarak görüldü. Deneklerin hiç birinde evre 4 görülmezken PC grubundaki deneklerin hiçbirisinde evre 4 ve 5 gözlenmedi.

5.TARTIŞMA

Daha önce literatürde rastlamadığımız İİR yapılan ratlarda PC' nin koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmamızda, hem doku, hem de kanda antioksidan parametre olarak TAS ve CAT, oksidan parametre olarak da TOS, MPO ve OSİ çalışıldı. Bunların yanında ALT, AST ve LDH enzim düzeyleri araştırıldı. Kollagenin yapım ve yıkımına olan etkilerini bulmak içinde prolidaz düzeyleri çalışıldı. Ayrıca, doku örnekleri histopatolojik olarak incelendi. Kontrol grubunda, iskemi sonrasında hem serum hem de dokuda AST, ALT, LDH, MPO, prolidaz değerlerinde anlamlı derecede artış ve CAT değerlerinde anlamlı dereced düşüş tespit edildi. Plazma ve dokuda TOS ve OSİ değerlerinde anlamlı bir artış meydana geldi. PC verilen grupta ise hem doku hem de kanda AST, ALT, LDH, MPO, prolidaz değerlerinde anlamlı bir düşüş tespit edildi. CAT değerinde ise anlamlı bir artış tespit edildi. OSİ ve TOS değerlerinde PC verilen grupta anlamlı bir düşüş tespit edildi. Fakat TAS değerlerinde hem doku hem de plazmada kontrol ve PC grubunda sham grubuna oranla istatistiksel olarak bir fark tespit edilmedi. Histopatolojik incelemede, PC verilen grupta İİRH'nın azaldığı tespit edildi.

İnce bağırsaklar iskemiye karşı son derece hassas bir dokudur. SOR' un majör kaynağı olan XO' yu en fazla bulunduran doku olma özelliğindedir(89). İİRH sonrasında olay sadece iskemik bağırsak dokusunda sınırlı olmayıp, genel inflamatuvar reaksiyonlar sonucunda uzak organlarda hasar meydana gelmekte ve bu da multiorgan yetmezliğine neden olmaktadır(90).

Sıçanlarda deneysel İİR modelinde SMA' nın klempenmesi suretiyle iskemi ve klempin açılmasıyla reperfüzyon oluşturma zamanları literatürde hala tartışmalı bir konu olma özelliğindedir. Daha derin iskemi oluşturmak için kollateral akımların kesildiği modeller de vardır. Parks ve arkadaşlarının çalışmasında ratlarda 20 dakikalık strangülasyon iskemisi oluşturulduğunda, bağırsak mukozasında hasar meydana geldiğini göstermişlerdir. Yirmi dakikanın üstündeki İRH da villus hasarı, 60 dakikayı aşan strangülasyonda transmukozal hasar, 8-12 saatlik total veya totale yakın iskemide ise transmural gangren geliştiğini göstermişlerdir. Yirmi dakikanın altında veya 8-12 saatlik sürenin üzerindeki iskemilerde reperfüzyonun iskemik hasarı arttırdığına dair veri olmadığından, en belirgin hasarın 40-60 dakikalık iskemi reperfüzyonla geliştiğini söylemektedirler(91). Bizim çalışmamızda da, bu

veriler ışığında, 60 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon protokolünü uyguladık ve kontrol grubunda iskemi ve reperfüzyon bulguları histopatolojik olarakta gösterildi.

Çalışmamızda 5 mg/kg dozunda PC seçildi. Literatür verileri incelendiğinde de PC'nin 1mg/kg dan 100 mg/kg'a kadar değişen dozlarda uygulandığı görülmektedir. PC'nin ratlarda toksik ve mutajenik olmadığını göstermek için yapılan bir çalışmada, PC'nin rat karaciğerinde faz I ve faz II ksenobiyotik metabolizma enzimleri üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Hem oksijenaz aktivitesinin 10 ve 100 mg/kg pinocembrin uygulananlarda kayda değer bir şekilde arttığı gösterilmiştir. PC'nin NADPH: sitokrom P450 redüktaz, NADPH quinone redüktaz, UDP-glukronil transferaz ve glutatyon-S-transferaz aktivitesini etkilemediği gösterilmiştir. Ayrıca, PC'nin CYP1A1, CYP2B1, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A2'yi içine alan faz I enzimlerinin ve NADPH sitokrom P450 nin de ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiştir. Sonuç olarak; PC'nin kısa dönem tedavisi hem oksijenaz aktivitesini artırdığı ancak diğer faz II ksenobiyotik metabolizma enzimlerinin aktivitelerini ve sitokrom P450 enzimlerinin ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiştir(92). Lili Shi ve ark. 1 ve 5 mg dozlarındaki PC ile yaptıkları çalışmada, doz bağımlı olarak antiinflamatuvar ve antioksidan özelliğinin arttığı tespit edilmiştir(93). Bu nedenle çalışmamızda antioksidan özelliği daha belirgin olduğu bulunan 5mg/kg PC dozu seçildi.

İİR üzerine yapılan çalışmalarda çok sayıda madde denenmiş, hala ideal maddeye ulaşamamıştır. Çalışmamızda kullanılan, PC ana maddesi olan propolis; bal arılarının ürettiği, insanların eski tarihlerden günümüz zamanına kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde kullandığı bir maddedir. PC, propoliste en yüksek konsatrasyonda bulunan flavonoiddir. Antimikrobiyal, vasorelaksatif, antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik aktiviteleri tespit edilmiş olan PC'nin özellikle beyinde iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir(93). Ayrıca PC kolon kanserli hücrelerde Bax bağımlı mitokondriyal apoptozisi indükleyerek ilaca dirençli kanser hücrelerinde tek başına ve kombine olarak kullanılabilceği tespit edilmiştir(94). Çelepli ve ark. yaptığı çalışmada, bal ve polenin intraabdominal adezyonları önleme etkisinin antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerine bağlı olduğunu deneysel olarak tespit etmişleridir(95). Ancak, literatür taramasında İİR hasarında propolis flavonoidlerinden biri olan PC'nin kullanımına rastlamadık. Bu çalışma bu alanda yapılan ilk deneysel çalışmadır.

PC'nin intestinal sistemde reperferfüzyon hasarını nasıl önlediğine dair veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, beyin dokusunda yapılan çalışmalarda PC'nin

nöroprotektif etkileri olduğunu gösteren çok sayıda kanıtlar vardır. Yapılan bir çalışmada 4 damarı tıkalı(4-VO) global serebral iskemi-reperfüzyonlu ratlarda PC'nin kan beyin bariyerinde mitokondriyal solunum fonksiyonu üzerine olan etkisi değerlendirilmiş, sonuç olarak; PC' nin ADP/O oranını, state 3 solunum fazını(V3), respirasyon kontrol rat indeksi (RCI) ve oksidatif fosforilasyon oranını(OPR) artırarak, 4-VO global serebral iskemi-reperfüzyonlu ratlarda beyin mitokondrilerinin solunumsal aktivitesini artırdığını göstermiştir. Ayrıca, PC'nin beyin mitokondrisi üzerine olan etkisi de değerlendirilmiştir. Bu etkilere bağlı olarak; PC'nin ADP/O oranını, state 3 respirasyon fazını, RCI ve NADH/FADH2 bağımlı respiratuar zincirde OPR' yi artırdığı ve NADH bağımlı respiratuar zincirde state 4 respirasyon fazını azalttığı ayrıca PC beyin mitokondri hücrelerinde ATP içeriğini artırdığı gösterilmiştir(96).

Meng F ve ark. yaptığı global iskemi/reperfüzyonlu ratlarda(GCI/R) PC'in kan beyin bariyeri fonksiyonları üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmada, nörolojik skorlar ve beyin ödemi değerlendirilmiş. Kan beyin bariyerinin permeabilitesi beyin dokusundaki Evans mavisi(EB) ve fluorescan sodyum(NaF) konsantrasyonlarının hesaplanması ile belirlenmiş. Kan beyin bariyerinin ultrasütrüktürel yapısındaki değişiklikler ise transmisyon elektron mikroskopisi ile gözlenmiş. Serebral kan akımı (CBF) ,laser doppler flowmetri ile ölçülmüş. PC'nin ratlardan elde edilen serebral mikrovasküler endotel hücre kültürlerinde(RCMECs) oksijen-glukoz yoksunluk/reoksijenizasyonu(OGD/R)'na karşı etkileride incelenmiş. Sonuç olarak; PC'in nörolojik skoru azalttığı ve GCI/R ile indüklenen beyin ödemi de azalttığını göstermiş. PC' nin GCI/R ratlarda beyin dokusundaki EB ve NaF konsantrasyonlarını da düşürdüğü ayrıca GCI/R ratlarda serebral mikrovasküler yapılar astrosit end-feet'de ve nöronlarda ultrasütrüktürel değişikliklerde azalmaya neden olduğu ve serebral kan akımının artmasına neden olduğu gösterilmiş. Buna ek olarak PC OGD/R ile indüklenmiş RCMECs kültürlerinde viabiliteyi ve mitokondriyal membran potansiyelini de artırdığı görülmüş ve bu veriler ışığında; PC'nin ratlarda, GCI/R ile indüklenmiş kan beyin bariyeri hasarını hafiflettiğini gösterilmiştir(97). Bu sonuçlar ışığı altında, PC bağırsakta da benzer etki mekanizması ile reperfüzyon hasarını hafifletebileceği söylenebilir.

Çalışmamızda iskemi hasarını değerlendirmek için hem doku hem de plazmada AST, ALT ve LDH değerlerine bakılmıştır. Literatürde de intestinal iskemide, ALT, AST, ALP, LDH, CK ve P düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle bu parametreler İİR tablosuna özel olmasa da, tanıda kullanılabilecek laboratuvar tetkikleri olabileceği

düşünülmektedir(98). Ayrıca Topaloğlu ve ark. yaptığı deneysel çalışmada da, intestinal iskemi sonrasında kanda bakılan AST, ALT ve LDH değerlerinde yükselme tespit edilip PG E₂ verilen grupta anlamlı olarak düşme olduğu tespit edilmiş(99). Çalışmamızda bakılan biyokimyasal parametrelerde, AST, ALT ve LDH İR yapılan kontrol grubunda, sham grubuna oranla anlamlı olarak yüksek tespit edildi Ayrıca, PC grubunda, kontrol grubuna göre hem doku hem de plazmada AST ALT ve LDH değerlerinde anlamlı azalma olduğu tespit edildi.

Oksidan parametre olarak, MPO ve TOS ve OSI değerlendirildi. Literatürde de, beyinde iskemi reperfüzyon yapıp, PC uygulanan ratlarda beyin dokusunda MPO SOD ve MDA değerlerine bakılmış. SOD aktivitesinde artış ve MPO ve MDA değerlerinde doz bağımlı olarak azalma tespit edilmiş. Bu sonuçlara göre, PC'nin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiokzotoksik etkilerinden dolayı global serebral iskemik hasara karşı nöroprotektif etki sağladığını tespit edilmiş(94). MPO, major bir nötrofil proteindir. Monositlerde de bulunmaktadır. İRH'da, oksidanların yaptığı MPO kaynaklı hasar iyi bilinen bir durumdur. SOR yüksek miktarda oluşur ve sonuçta hücre membranında bulunan serbest yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Hücrenin diğer komponentlerinin peroksidasyonu bu olayı takip eder. Bu reaksiyon, İRH patogeneğinde önemli bir rol almaktadır(100). Bizim çalışmamızda da intestinal dokuda bakılan MPO değerlerinde benzer olarak kontrol grubuna göre PC grubunda düşme tespit edilmiştir.

Katalaz, iskemi reperfüzyon hasarı ile ilgili yapılan biyokimyasal çalışmalarda bakılan bir antioksidan defans enzimidir. Bu enzim düzeyi iskemi reperfüzyon yapılan ratlarda belirgin olarak azalmaktadır. Bağcı ve ark. yaptığı ketaminin farklı dozlardaki İİRH' da koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada kontrol grubunda sham grubuna göre CAT değerinde düşme olduğu, ayrıca ilaç grubunda kontrol grubuna göre CAT değerinde anlamlı bir artış olduğu görülmüş(101). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde katalaz düzeyinde azalma olmuştur. Bu da PC' nin antioksidan özelliğini desteklemektedir.

Oksidatif stres indeksi (OSİ), oksidan ve antioksidan dengenin oksidan tarafında veya antioksidan tarafında mı artma olduğunu tespit etmek için kullanılan bir parametredir. Total oksidanların total antioksidanlara bölünmesi sonucu tespit edilir. oksidan ve/veya antioksidanların tek başına kullanılmasından ziyade OSİ' nin kullanılması daha değerlidir. OSİ değeri, oksidanların artması veya antioksidanların azalması nedeniyle artması sonucunda kompanze olmayan serbest radikallerin lipidlerde peroksidasyonuna, proteinlerde oksidasyona ve DNA'da hasarlanmaya neden olabilir. Oksidatif stresi kompanze edebilecek düzeyde

antioksidanların bulunması ise oksidan ve antioksidanların normal düzeylerde olduğunu göstermektedir. Bu durumda oksidatif stres indeksi düşük olacağı için oksidatif strese bağlı lipit peroksidasyonları, protein oksidasyonu ve DNA hasarları beklenmemektedir. Terzi ve ark yaptığı İİRH' de Nigella sativanın ileum dokusu üzerinde koruyucu etkisinin incelendiği çalışmada TAS değerinde artma, TOS ve OSİ değerlerinde azalma tespit edilmiş(102). Bizim çalışmamızda da TOS ve OSİ değerlerinde azalma mevcut olup çalışma ile uyumludur. Ancak TAS değerleri bakımından anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bu yüzden PC' nin İİRH' de oksidatif stresi azalttığı söylenebilir. Ancak antioksidan etki mekanizması için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Prolidaz, hidrolazlar sınıfına ait bir enzim olup çeşitli bağların hidrolizini kataliz eder. Bu bağlar; C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit bağını da içeren bazı bazlardır. Prolidaz enzimi karboksil terminal pozisyondaki prolin veya hidroksiprolin içeren dipeptitlerin hidrolizini katalizler. Kollajenin yapısında yüksek miktarda prolin ve hidroksiprolin bulunduğu için bu enzim kollajen ve prokollajen yıkımında önemli bir rol almaktadır. Prolidaz fibroblastlar' dan elde edilir. Prolidaz; kollajen yapısındaki prolinin glisil ile yaptığı peptid bağını yıkan tek enzim olduğu için, aktivitesinin kollajen turnover hızı ile direkt olarak ilişkili olması beklenir. Uzunköy ve Anlı' nın yaptığı klinik çalışmada apendiks lümeni obstrükte olduğunda artan serbest oksijen radikalleri aracılığıyla indüklenen oksidatif stres parametreleri ile prolidaz enzim aktivitesi eş zamanlı olarak artmaktadır(103). Bizim çalışmamızda da, hem doku hem de kanda iskemi reperfüzyon yapılan kontrol grubunda prolidaz seviyesi artmaktadır. Bu sonuca göre kollajen yıkımı artmış olarak kabul edebiliriz. Ancak PC grubunda prolidaz aktivitesi anlamlı olarak azalmaktadır. Prolidaz seviyesinin düşmesi kollajen yıkımının azaldığını bize gösterebilir.

İİRH' da histopatolojik olarak değerlendirilmesinde değişik sınıflamalar mevcuttur. Çalışmamızda seçilen, Chiu sınıflaması antioksidan ajanların etkisinin incelenebildiği kolay, sade ve ince bağırsak doku hasarını iyi göstermesi nedeniyle tercih edilen bir skorlama sistemidir. Çalışmamızda histopatolojik incelemede, PC verilen grupta, istatistiksel olarak anlamlı oranda bir doku hasar azalmasının olduğu tespit edildi. Ayvaz ve ark. rat ince bağırsağında deneysel İRH oluşturdukları çalışmalarında N-Asetil sisteini kullanmışlar ve intestinal morfoloji değişikliklerini Chiu ve arkadaşlarının tarif ettiği skorlama sistemine göre incelemişlerdir. Histopatolojik skorlamada kontrol grubuna göre, çalışma grubunda anlamlı düşüş tespit etmişlerdir(104). PC nörovasküler üniteyi (NVU) koruma mekanizmalarının

anlaşılması için yapılan bir çalışmada PC' nin inflamatuvar kaskadı inhibe ederek, MMP-9 ekspresyonunu azaltarak ve tight junctionların bağlılığını koruyarak rat beynini iskemik hasara karşı koruyabileceği gösterildi(105). Bizim çalışmamız da da, PC' nin İİR barsak mukozasını hasara koruduğu gözlendi. Bu etkinin benzer mekanizmalarla olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; alışmamızda PC'nin İİRH' da koruyucu etkisi olduğu biyokimyasal ve histolojik olarak tespit edildi. Ancak çalışmanın ilk defa yapılıyor olması nedeniyle, PC'nin maksimum koruyucu etkisinin ortaya çıkarılması için veriliş zamanı, şekli, iskemi reperfüzyon süresi ve etkin doz açısından ek çalışmalar gerekmektedir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda; PC'nin İİRH' da koruyucu etkisi olduğu kontrol grubuna göre PC grubunda hem doku hem de plazmada TOS, OSİ, prolidaz, MPO, AST, ALT ve LDH değerlerinde anlamlı bir azalma olduğu ve CAT değerlerinde artma olduğu istatistiksel olarak tespit edildi. Ayrıca histopatolojik olarak da koruyucu etkisinin olduğu gösterildi. Fakat hem doku hem de plazmada TAS değerleri açısından anlamlı bir istatistiksel sonuç elde edilemedi. Ancak; çalışmanın ilk literatür olması nedeniyle, PC'nin maksimum koruyucu etkisinin gösterilebilmesi için, veriliş zamanı, şekli, iskemi reperfüzyon süresi ve etkin doz açısından ek çalışmalar gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Kuzu MA, Tarık A, Kale T, Aşlar AK ve ark. Effects of ischemia reperfusion as asystemic phenomenon on anastomotic healing in the left colon. *World J Surg.* 2000;24(8):990-994.
2. Dixon M.F. The small intestine. In: Whitehead R (Eds). *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology.* Livingstone: Curchill;1995.p.665-77.
3. Zhao J, Yu S, Tong L, Zhang F ve ark. Oxymatrine attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Surg today* 2008;38:931-937
4. Groggaard B, Parks DA, Granger DN, Mc Cord JM,Forsberg JO. Effects of ischemia and oxygen radicals on mucosal albumin clearance in intestine. *Am J Physiol* 1982 ; 242: G448 54.
5. Parks DA, Granger DN.İschemia-induced vasculer changes : role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals: *Am J Physiol* 1983; 245: G285-9.
6. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994;81:637-647.
7. Haglund U. Gut ischemia. *Gut* 1994;1;73-76.
8. Uncu H, Uncu G, İlçöl Y, Aker Y. Diagnosis of intestinal ischemia by measurement of serum phosphate and enzyme changes and effectiveness of vitamin E treatment. *Turk J Gastroenterol.* 1999; 10:3, 272-275.
9. Giulia DC, Mascolo N, Angelo AL, et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 1999; 65: 337-53.
10. Fanrui Meng, Rui Liu Mei Gao,Yuehua Wang, Xiaoyan Yu et al. Pinocembrin attenuates blood–brain barrier injury induced by global cerebral ischemia–reperfusion in rats .*Brain Res.* 2011: 93-101.

11. Kumbul K. Deneysel intestinal iskemi ve reperfüzyon modelinde caffeic acid phenethyl ester'in akciğer hasarını önlemedeki etkinliği. SDÜTF Genel Cerrahi AD Uzmanlık Tezi 2007.
12. Erimoğlu C. İnsan anatomisi. İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, 1990:132-5.
13. Özkuş K, Demirci S, Barlas BO. İnce bağırsak anatomisi. J Surg Med Sci 2005;1(8):1-2.
14. Kalaycı G. Genel cerrahi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002:374-5.
15. Genç F.A. Damar Cerrahisinde Acil Durumlar. 1. baskı, Türk Cerrahi Derneği Yayınları, 2012;90-91
16. Hot S. Akut mezenterik iskeminin tansında D-Dimerin önemi. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 5. Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2006; 6
17. Gürbüz AK. İskemik barsak hastalıkları.[serialonline].2007.[http://www.endoskopist.org.images/muayenehane.jpg](http://www.endoskopist.org/images/muayenehane.jpg).
18. Dilege Ş. Mezenter Damar Hastalıkları. Genel Cerrahi'de. 2. baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi; 2002;883-93
19. Törüner A. Mezenterik vasküler hastalıklar. Temel Cerrahi. Ankara, Güneş Kitabevi; 2004, 1499-1502.
20. Modified from Rosenblum JD, Boyle CM, Schwartz LB. The mesenteric circulation: anatomy and physiology. Surg Clin North Am 1997.77(2): 289-306.
21. Şener G, Yeğen B.Ç. İskemi Reperfüzyon Hasarı. Klinik Gelişim Dergisi.2009;22:5-13.
22. İlekel H, İlekel S, Güner G: Biochemical mechanism tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. Part 1:Biochemical mechanism. Norol Bil D,2000. 17:2.
23. Schrier RW, Burke TJ: Role of calcium-channel blockers in preventing acute and chronic renal injury. J Cardiovasc Phar. 1991;18 (suppl.): 38-43.

24. Kowaltowski AJ et al: Ca⁺²- induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *Am J Physiol*. 1995;269 C141-147.
25. Kumar V, Cotran R, Robbins SL. *Basic Pathology*, 8th ed. WB Saunders; 2007;13-18.
26. Michalik L, Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest*. 2006;116:598-606.
27. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:749-753.
28. Mc Cord: Oxygen-derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury.P.159-163.Ed.F.H.Epstein.İn (Mechanism of disease): The New England Journal of Medicine1985;17.
29. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS and Valeri CR: Pathophysiology of ischemia reperfusion injury, central Role of the neutrophil. *Br J Surg* 1997 ;78: 651-5.
30. Grace PA: Ischemia- reperfusion injury *Br J Surg*.1994; 81:637-647.
31. Schoenberg MH, Beger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol Interact* 1990;76(2):141-61.
32. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004;49(9):1359-77.
33. Neblina FL, Toledo AH, Pereyna LHT. Molecular biology of apoptosis in ischemia reperfusion. *Journal of Investigative Surgery* 2005;18:335-350.
34. Su-Lan L, Wen-Yin C, Shue-Ling R, Jon-Son K, Chun-Jung C. Association of immune responses and ischemic brain infarction in rat. *Molecular Neuroscience* 2001;12:1943-1947.
35. Kuzu M.A. İnflamasyon, Sistemik İnflamatuvar Reaksiyon sendromu ve peritonitin Fizyolojisi. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2001; 5:69-83.

36. Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL: Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol* 1999;36: 941-8.
37. García-Villalón AL, Amezcua YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol*. 2008;
38. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162-170.
39. Stoney RJ, Cunningham CG. Acute mesenteric ischemia Surgery. 1993;114:489-90.
40. Kimura M, Kataoka M, Kuwabara Y, Sato A, Sugiura M, Fujii Y. Real-time energy metabolism of intestine during arterial versus venous occlusion in the rat. *J Gastroenterol*. 2003;38:849-53.
41. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190(3):255-66.
42. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemiareperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1986;548:47-63.
43. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Lesão e morte celular. Robbins: patologia estrutural e funcional. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996;1-30.
44. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985;312:159-63.
45. Cuzzocrea S, Chatterjee P, Mazzon E, Dugo L, De Sarro A, Van de Loo FAJ, Caputi AP, Thiemermann C. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. *Shock*. 2002;18:169-76.
46. João AS, Alencar SSS, Medeiros AC, Diniz SOF, Cardoso VN, Brandt CT. Translocation of ^{99m}Tc labelled bacteria after intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras*. [serial online] v.19 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/acb> [also in CD-ROM]. Acesso em: 15 ago 2004.

47. Aydemir-Koksoy A, Koksoy C, Kuzu MA, Demirpence E, Cinel I, Kesenci M, Yavuzer S. Intestinal ischemia reperfusion leads to platelet dysfunction. *Thromb Res.* 1999;94; 395-400.
48. Yoshida WB. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. *Cir Vasc Angiol.* 1996;12; 82-95.
49. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988;255:1269-75.
50. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos doenças relacionadas sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Brasil.* 1997;43:61-8.
51. Xia G, Martin AE, Besner GE. Heparin-binding EGF-like growth factor downregulates expression of adhesion molecules and infiltration of inflammatory cells after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 2003;38: 434-9.
52. Yoshida WB. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. *Cir Vasc Angiol.* 1996;12; 82-95
53. Chan KL, Zhang XH, Fung PCW, Guo WH, Tam PKH. Role of nitric oxide in intestinal ischaemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. *Br J Surg.* 1999;86:1427-32.
54. Sekhon B, Sekhon C, Khan M, Patel SJ, Singh I, Singh AK. N-Acetyl cysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2003;971:1-8
55. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, et al. Suppression of intestinal ischemia-reperfusion injury by a specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand pioglitazone in rats. *Redox Rep.* 2002;7:294-99.
56. Montalto MC, Hart ML, Jordan JE, Wada K, Stahl GL. Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. *Am J Physiol.* 2003;285:G197-206.

57. Zou L, Attuwaybi B, Kone BC. Effects of NF-kappa B inhibition on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 2003;284: G713-21.
58. Fleming SD, Mastellos D, Karpel-Massler G et al. C5a causes limited polymorphonuclear cell-independent mesenteric ischemia/reperfusion-induced injury. *Clin Immunol.* 2003;108:263-73. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: 15 ago 2004.
59. Zhang M, Austen WG Jr, Chiu et al. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:3886-91.
60. Cooper D, Chitman KD, Williams MC, Granger DN. Time dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284:1027-3336.
61. Teramoto Y, Urano T, Nagai N, Takada Y, Ikeda K, Takada A. Plasma levels of 5-HT and 5-HIAA increased after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Jpn J Physiol.* 1998;48:333-9.
62. Rosario HS, Waldo SW, Becker SA, Schmid-Schonbein GW. Pancreatic trypsin increases matrix metalloproteinase-9 accumulation and activation during acute intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Pathol.* 2004;164:1707-16.
63. Wu B, Iwakiri R, Ootani A, Fujise T, Tsunada S, Fujimoto K. Platelet-activating factor promotes mucosal apoptosis via FasL-mediated caspase-9 active pathway in rat small intestine after ischemia-reperfusion. *FASEB J.* 2003;17:1156-8.
64. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; Sep 1; 90 (17): 7915-22.
65. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40.

66. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M. Agecorrelated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 1992;38:66-70.
67. Barber DA and Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm* 1994;NS34:26-35.
68. Beutler E: Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. New York: In Grune and stratton- 1973;74.
69. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161:488-503.
70. Wheeler CR., Salzman JA. Automated Assay for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activity. *Anal Biochem.* 184:193-199, 1990.
71. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in moden medicine. *Fitoterapia* 2002; 73: 1-6.
72. Giulia DC, Mascolo N, Angelo AL, et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 1999; 65: 337-53.
73. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002; 73: 21-29.
74. Ilhan A, Koltuksuz U, Ozen S, et al. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemial/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 16: 458-463.
75. Demestre M, Messerli SM, Celli N, et al. CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)- based propolis extract (Bio 30) suppresses of human neurofibromatosis (NF) tumor xenograft in mice. *Phytother Res* 2009; 23: 226-230.

76. Lee KW, Kang NJ, Kim JH, et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B. *Genes Nutr* 2008; 2: 319-322.
77. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* 2002;73(1):53-63.
78. Volpert R, Elster EF. Interactions of different extracts of propolis with leukocytes and leukocytic enzymes. *Arzneimittelforschung* 1996;46(1):47-51.
79. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;55(6):441-9.
80. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganda, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20;2006:933- 56.
81. Bankova VS, Popov SS, Marekov NL. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J Chromatogr A* 1982;242:135-43.
82. Yıldız F, Terzi A, Çoban S, Bitiren M, Çelik H, Aksoy N, Özdoğan MK, Çakır H. Purified micronized flavonoid fraction ameliorates the injury of spleen and ileum secondary to hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Dig Dis Sci*. 2009;10: 22.
83. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004;37: 277-285.
84. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005; 38:1103-1111.
85. Harma M, Kocyigit A, Erel O. Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *Mutat Res*. 2005;5:49-54.
86. Chinard P. Photometric determination of proline and ornithine. *J Biol Chem*. 1952;199: 61-65.

87. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991;196: 143–151.
88. Wei H, Frenkel K. Relationship of oxidative events and DNA oxidation in SENCAR mice to in vivo promoting activity of phorbol ester-type tumor promoters. *Carcinogenesis* 1993;14: 1195-1201.
89. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R et al. Experimental surgery intestinal mucosal lesion in low-flow states a morphological, hemodynamic and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101:478-483.
90. Tjarnsrtom J, Wikstorm T, Bagge U: Effects of hyperbaric oxygen treatment on neutrophil activation and pulmonary sequestration in intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Eur Surg Res* , 1999;31: 147.
91. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, et al. The sequence of development of intestinal tissue injury after ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; 107: 574- 580.
92. Punvittayagul C, Wongpoomchai R, Pompimon W Effect of isolated from bosenbergia pandurata xenobiotic- metabolizing enzymes in rat liver *Drug Metabb Lett*.2011Jan;(5):1-5.
93. Shi LL, Chen BN, Gao M, Zhang HA, Li YJ, Wang L, Du GH. The characteristics of therapeutic effect of pinocembrin in transient global brain ischemia/reperfusion rats. *Life Sci*. 2011 Mar 14;88(11-12):521-8. Epub 2011 Jan 22.
94. Kumar MA, Nair M, Hema PS, Mohan J, Santhoshkumar TR. Pinocembrin triggers Bax-dependent mitochondrial apoptosis in colon cancer cells. *Mol Carcinog*. 2007 Mar;46(3):231-41.
95. Celebli S, Kısmet K, Buğra K. The effect of oral honey and pollen on postoperative intraabdominal adhesions. *Turk J Gastroenterol* 2011; 22 (1): 65-72.

96. Shi LL, Qiang GF, Gao M, Zhang HA, Chen BN, Yu XY, Xuan ZH, Wang QY, Du GH. Effect of pinocembrin on brain mitochondrial respiratory function. Yao Xue Xue Bao. 2011 Jun;46(6):642-9.
97. Meng F, Liu R, Gao M, Wang Y, Yu X, Xuan Z, Sun J, Yang F, Wu C, Du G. Pinocembrin attenuates blood-brain barrier injury induced by global cerebral ischemia-reperfusion in rats. Brain Res. 2011 May 19;1391:93-101. Epub 2011 Mar 22.
98. Uncu H, Uncu G, İlçöl Y, Aker Y. Diagnosis of intestinal ischemia by measurement of serum phosphate and enzyme changes and the effectiveness of vitamin E treatment 1999 The Turkish Journal of Gastroenterology 1999, Volume 10, No 3, Page(s) 272-275.
99. He effects of prostaglandin E₂ on ischemia- reperfusion damage, resulting From Mesenter arterial ischemia in small intestines . Ulusal Travma Acil Cerrahi Dergisi. 1997; 3(4): 258-264.
100. Silva MG, Castro AA, Ramos EAG, Peixoto E, et al. Histological and biochemical serum effects of alpha-tocopherol on ischemia-reperfusion injuries induced in the pelvic limb of rats. Acta Cir Bras 2005; 20 (5): 375-381.
101. Bağcı M. K. Ratlarda intestinal iskemi reperfüzyon hasarında ketaminin farklı dozlarının etkileri. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv. Tıp Fak. Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD Uzmanlık Tezi 2011.
102. Terzi A, Coban S, Yildiz F, Ates M, Bitiren M, Taskin A, Aksoy N. Protective effects of Nigella sativa on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. J Invest Surg. 2010, 23(1):21-7.
103. Anlı E. Akut apandisit olgularında oksidatif stres ve prolidaz enzim aktivitelerinin araştırılması HÜTF Genel Cerrahi AD Uzmanlık Tezi, Şanlıurfa, 2009.
104. Ayvaz S, Pul M. N-Asetilsisteinin intestinal iskemi-reperfüzyon hasarına etkisi. Trakya Üniv. Çocuk Cerrahisi AD, Uzmanlık Tezi, Edirne, 2005.

105. Gao M, Zhu SY, Tan CB, Xu B, Zhang WC, Du GH. Pinocembrin protects the neurovascular unit by reducing inflammation and extracellular proteolysis in MCAO rats. *J Asian Nat Prod Res.* 2010 May;12(5):407-18.