

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**“TAVŞANLARDA OLUŞTURULAN RETİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINA RESVERATROL, TRİMETAZİDİN VE NADH
MADDELERİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ”**

Çiğdem GÖVER

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2012**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**“TAVŞANLARDA OLUŞTURULAN RETİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINA RESVERATROL, TRİMETAZİDİN VE NADH
MADDELERİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ”**

Çiğdem GÖVER

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2012**

İÇİNDEKİLER

ÖZ	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
Simgeler Dizini	viii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Gözün Yapısı	5
2.1.1. Göz Küresini Çevreleyen Tabakalar	5
2.1.2. Humor Vitreus ve Humor Aquous	7
2.1.3. Retina Anatomisi	7
2.2. Oksidatif Stres	9
2.2.1. Serbest Radikaller	10
2.3 İskemi	24
2.3.1 Geri Dönüşümlü Zedelenme:	31
2.3.2 Geri Dönüşümsüz Zedelenme:	32
2.3.3. Serbest radikallerin iskemideki rolü	34
2.4. Apoptozis	37
2.4.1. Apoptozisde Hücre Morfolojisi	38
2.5. Kullanılan Maddeler	39
2.5.1. NADH(Nikotin Adenin Dinükleotid Hidrit)	39
2.5.2. Resveratrol	40
2.5.3. Trimetazidin	44
3. MATERYAL ve YÖNTEM	46
3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	46

3.2. Anestezi Tekniği	47
3.3. İskemi-Reperfüzyon Oluşturulması	47
3.4. DNA fragmentasyonu (Apoptozis) analizi	49
3.4.1 Örneklerin hazırlanması:	49
3.5. Nitrik Oksit Analizi	51
3.5.1.Doku Homojenizasyonu:.....	51
3.5.2.Kit İçeriğindeki Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması:.....	51
3.6.HPLC ile Pürin miktarlarının ölçülmesi	53
3.6.1.Numunenin hazırlanması :	53
3.6.2.Standartların Hazırlanması:.....	54
3.6.3.HPLC Analiz Şartları :	54
4. ARAşTIRMA BULGULARI VE TARTIşMA.....	55
4.1. Araştırma Bulguları.....	56
4.1.1. Klinik Sonuçlar:	57
4.1.2. DNA fragmentasyonu (Apoptozis) sonuçları:	57
4.1.3 HPLC sonuçları :	58
4.1.4.Nitrik Oksit Analizi Sonuçları:	62
4.2.Tartışma	65
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR	69

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAVŞANLARDA OLUŞTURULAN RETİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA RESVERATROL, TRİMETAZİDİN VE NADH MADDELERİNİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Çiğdem GÖVER

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ
Yıl: 2012, Sayfa: 77

Bu çalışmada, Resveratrol, Trimetazidin ve NADH maddelerinin tavşanlara 30 gün boyunca verilmesini takiben oluşturulan retinal iskemi ve reperfüzyon aşamasında meydana gelen hasarlar incelendi. Hayvanlar rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. Gruplar; Kontrol (herhangi bir madde verilmeyen), Resveratrol + İ-R, Trimetazidin + İ-R ve NADH + İ-R olarak adlandırıldı. Resveratrol grubuna 25 mg/ml/kg, 48 saat aralıklar olmak üzere DMSO'da çözülmüş resveratrol, Trimetazidin grubuna saf suda çözülmüş günlük 10 mg/kg olmak üzere 12 saat aralıklarla 2 doz halinde, NADH grubuna 10 mg/kg olmak üzere 24 saat aralıklarla olmak üzere madde verimi yapıldı. 30 günlük madde verimi tamamlandıktan sonra deneyde hayvanların bir gözüne iskemi-reperfüzyon işlemi uygulanırken diğer gözü kontrol olarak kullanıldı. 24 saat reperfüzyon sonrasında hayvanlar kesildi. Daha sonrasında retinalar analizler için izole edildi. Homojenize edilen retina örneklerinde nitrik oksit (NO) ve apoptozis sonucu oluşan hasarlar incelendi. Ayrıca retinada HPLC ile iskemi sonucu oluşan enerji miktarlarındaki değişimler incelendi.

Anahtar kelimeler : Retinal iskemi, Resveratrol, NADH, Trimetazidin

ABSTRACT

Master Thesis

THE INVESTIGATION OF RESVERATROL, TRIMETAZIDINE AND NADH EFFECTS ON RETINAL ISCHEMIA-REPERFUSION DAMAGE FORMED IN RABBITS

Çiğdem GÖVER

**Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

Year: 2012, Page : 77

In this study, resveratrol, trimetazidine and NADH were administrated to the rabbits for 30 days to examine damage which occurred during retinal ischemia and reperfusion. The animals were classified randomly into four groups. Groups were named, the control (not any substances given), Resveratrol+I-R, Trimetazin+I-R, and NADH+I-R. Experimental groups received the substances as indicated below: Resveratrol group took 25 mg/ml/kg of resveratrol which was dissolved in DMSO and given to rabbits with at an intervals of 48 hours, trimetazidine group took 10 mg / kg doses of trimetazidine which dissolved in distilled water and 2 times in a day with 12 hour intervals, NADH group which took 10 mg/kg NADH with 24 hour intervals. During experimental application while one eye was used for ischemia-reperfusion, the other eye was used as control. After 24 hour reperfusion, rabbits were dissected and the retinas were isolated for analyses. Homogenized retina samples were prepared and used for nitric oxide and apoptosis analysis. Furthermore the changes in energy amount, which, prepared was caused by ischemia in retina were measured by HPLC in retina.

KEY WORDS: Retinal ischemia, Resveratrol, NADH, Trimetazidine

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca değerli bilgi ve deneyimini aktararak her zaman yanımda olan ve bu sürede sabır ve anlayışını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nihat DİLSİZ'e ve değerli zamanlarını ayırarak yardımını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ'a emek ve katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında destek ve yardımlarını gördüğüm sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Semih SAYIN'a, doktora öğrencisi Aslı YÜRÜKOĞLU'na, bu süreçte moral ve destek olan Yrd. Doç. Dr. Ebru UYAR hocama ve Teknisyen Eyyüp YAŞAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yaptığım çalışmaların ölçülmesi konusunda çalıştığım cihazlar için Harran Üniversitesi Merkezi Laboratuvarına (HÜMEL) teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca yaşantımın her döneminde hep yanımda hissettiğim ve her konuda destek olan sevgili anneme ve babama sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Standart solüsyon konsantrasyonları.....	51
Çizelge 2. Karışımın mikropalakalara yüklenmesi.	52
Çizelge 3. HPLC akış gradienti.....	54
Çizelge 4. HPLC analiz sonuçları	63
Çizelge 5. Retina dokularındaki nitrik oksit miktarı.....	65
Çizelge 6. Nitrik oksit standartlarının kalibrasyonu.....	65
Çizelge 7. Gruplara ait retina örneklerinde Nitrik oksit miktarları.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Gözün anatomik yapısı	6
Şekil 2. Retina kanallarında bulunan hücreler	8
Şekil 3. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri	9
Şekil 4. Nitrik oksit biyosentezi	17
Şekil 5. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve oluşturdukları hasarlar.....	23
Şekil 6. İskemi hasarı	26
Şekil 7. Adenozin üretimi	28
Şekil 8. İskemi-reperfüzyon sonrasında meydana gelen SOR ve doku hasarı	29
Şekil 9. Apoptozis ve İskemi ilişkisi.....	39
Şekil 10. Resveratrolün yapısı	42
Şekil 11. İskemi modeli.....	47
Şekil 12. İskemi oluşturulmuş tavşanlar.....	48
Şekil 13. DNA fragmentasyon jel görüntüsü	56
Şekil 14. HPLC pürin standartları karışım kromatogramı	58
Şekil 15. Kontrol grubu İ-R yapılmamış sağlıklı göz.....	59
Şekil 16. Kontrol grubu İ-R uygulanan göz.....	59
Şekil 17. NADH grubu İ-R uygulanmayan göz.....	60
Şekil 18. NADH grubu İ-R uygulanan göz.....	60
Şekil 19. Resveratrol grubu İ-R uygulanan göz.....	61
Şekil 20 Resveratrol grubu İ-R uygulanmayan göz.....	61
Şekil 21 Trimetazidin grubu İ-R uygulanan göz.....	62
Şekil 23 HPLC analiz sonuçları.....	63

Simgeler Dizini

ATP: Adenozin tri fosfat

RPE: Retina pigment epiteli

NO: Nitrik oksit

I-R: İskemi reperfüzyon

NADH: Nikotin adenin dinükleotid hidrit

ROS: Reaktif oksijen türleri

SOD: Süperoksit dismutaz

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

TMZ: Trimetazidin

HPLC: High performance liquid chromatography (yüksek performanslı sıvı kromatografisi)

DMSO : Dimetil sülfoksit

1. GİRİŞ

İskemi, bir dokuyu besleyen arteriyal sistemin belli bir zaman dilimi içinde tıkanması sonucunda ortaya çıkan bir durumdur. İskemik hasarın giderilmesi için bu kritik zaman dilimi içinde dokunun tekrar oksijen ile beslenmesi gerekmektedir.

Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer (Grace, 1994). Bu durum laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Sonuçta hücre kendi homeostazi için gerekli olan enerjiden yoksun kalır.

Dokuların iskemiye dayanıklılığı birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabildiği halde nöronlarda dakikalar içinde geri dönüşümsüz yıkım ortaya çıkabilir. Hücresel homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP'nin tüketimi, hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar. Na^+ ve Ca^{++} iyon dengesi bozulur. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder (Semenza, 2000; Girotti, 2000).

İskemi oluşmuş dokunun kan akışının tekrar sağlanmasına reperfüzyon denilmektedir. İskeminin kritik süresi dolmadan, doku reperfüze edilirse hücreler ölümden kurtulabilir. İskemi süresinin uzaması reperfüzyona rağmen ölüm riski olan hücrelerin sayısını artırır. Bu hücreler geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girdikleri için reperfüze edilseler bile nekroza girerler.

Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır (Kuzu ve ark., 1998). Böylelikle reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir.

Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır (Zimmerman, 1992).

Reperfüzyon hasarının büyük bölümünden serbest radikaller sorumlu tutulmaktadır. Bir veya daha çok sayıda eşleşmemiş elektron içeren serbest radikaller biyomolekülleri okside edip hücre ölümüne sebep olabilmektedirler (Çelebi ve ark., 2002, Baykal ve Kocabalkan, 2000).

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda iskemi-reperfüzyon hasarının reperfüzyon kısmının mediatörleri olan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar.

Göz, aşırı miktarda serbest radikal etkisine maruz kalan bir organdır. Çünkü retina oksijen bakımından zengin olup büyük miktarda doymamış yağ asidi içerir. Retina pigment epiteli (RPE) hücreleri sürekli olarak her gün bir çok fotoreseptör dış segmentini parçalamakta ve fagosite etmektedir. RPE lokalizasyonu, fotik reaksiyonlar ve koriokapillaristen difüze olan yüksek parsiyal oksijen (PO_2) seviyesi ve buradaki yüksek metabolik aktivite sonucu serbest radikal üretimi ve bunların etkisine maruz kalma riski artmaktadır (Braguet ve Doly, 1986; Yeh ve Ashton, 1990).

Diabetik retinopati, retinal vasküler oklüzyon, glokom, prematüre retinopatisi gibi ciddi göz hastalıklarının gelişiminde ve progresyonunda retina iskemisinin önemi çok büyüktür. Serbest radikaller, iyonize radyasyon, stres yapıcı durumlar, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucunda vücuttaki biyolojik fonksiyonların yan ürünü olarak oluşurlar (Basaga, 1990).

İyonize radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede değişime ve ölüme yol açarlar. DNA yapısındaki pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma ve yıkım sonuçta DNA'nın denatürasyonuna neden olur. Oksidatif hasar zincir kırıkları, baz çifti değişimleri, yeniden düzenlenme gibi yapısal değişimlere neden olmaktadır. DNA, serbest radikallerden kolaylıkla zarar görebilen önemli bir hedef moleküldür (Winrow, 1993; Halliwell, 1994).

Hücrelerin maruz kaldığı hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınları gibi dış etkenler apoptoza neden olabilmektedir. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak hücrede apoptozis meydana getirirler.

Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptozis, hücre ölümünü tetikleyen fizyolojik veya patolojik stimülüs ile indüklenmekte, uyarı hücre ölüm uyarısına dönüşmekte, proteolitik kaspazların aktivasyonu ile başlamakta ve ölen hücre fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır (Bosman ve ark., 1996) Apoptozis, insanlarda ve pek çok canlıda normal gelişme ve erişkin yaşamı için hayati önem taşımaktadır. İnsanlarda apoptotik mekanizmanın bozulması kanser, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıkların gelişmesine neden olabilir. Bu hastalıklarda apoptozu kontrol eden mekanizmaların anlaşılması yeni tedavi imkanlarına kapı açabileceği için önemli görünmektedir.

İskemi sonucu oluşan hasarların zararlarını ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için organizma tarafından çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmiştir.

Bu mekanizmaların başında antioksidan özelliği olan maddelerle oluşan hasarları engellemektir. Retinal dokuda oluşan hasarın ve iyileşmenin düzenleyicisi olan moleküller yanında patolojik süreçte rol olan birçok faktörün varlığı gösterilmiştir. Aynı zamanda retinada hücrelerin birbirleriyle etkileşimi, nörotransmitter olarak adlandırılan kimyasal araçlarla da sağlanmaktadır.

Resveratrolün antioksidan özelliği, endotelial nitrik oksit (NO) üretimini arttırması ve apoptozisi engellemesi bizi, resveratrolün intraperitoneal olarak verilmesinin iskemi-reperfüzyon (IR) hasarını önleyici, organ disfonksiyonlarını azaltıcı etkisi olup olmadığı konusunu araştırmaya yöneltmiştir. Resveratrol'ün yanı sıra NADH, insan vücudunda tüm canlı hücrelerde doğal olarak bulunan, bir koenzimdir. NADH maddesinin iskemi esnasında ve sonrasında oluşan hasarlara karşı önleyici etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Trimetazidin maddesi iskemik süreçte kullanılan anti iskemik bir maddedir.

Çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılması amaçlanmıştır:

Hayvan gruplarına; NADH, Resveratrol ve Trimetazidin maddeleri verilip sonrasında oluşturulacak retinal iskemi-reperfüzyon aşamasında oluşan hasarı incelemektir. İskemi reperfüzyon sonrası gruplarda retinadaki nitrik oksit miktarının incelenmesi, pürin miktarlarındaki değişimin HPLC ile belirlenmesi ve yine retina dokusunda apoptozise bakılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Gözün Yapısı

Göz, kafatası içinde koruyucu kemik yapılarda (orbita) yer alan fotosensitif bir organdır. Her göz şeklini koruyan fibröz bir küreden, görüntüyü odaklayan bir mercek sisteminden ve merkezi sinir sistemine görüntü bilgisini toplayan, işleyen ve nakleden hücre ve sinir sisteminden oluşur. Göz iç içe üç tabakadan oluşur; dışta sklera ve kornea, ortada koroid (korus siliyare ve iristen oluşan vasküler tabaka), içte ise iki kattan oluşan retina denilen sinir dokusu tabakası yer almaktadır.

2.1.1. Göz Küresini Çevreleyen Tabakalar

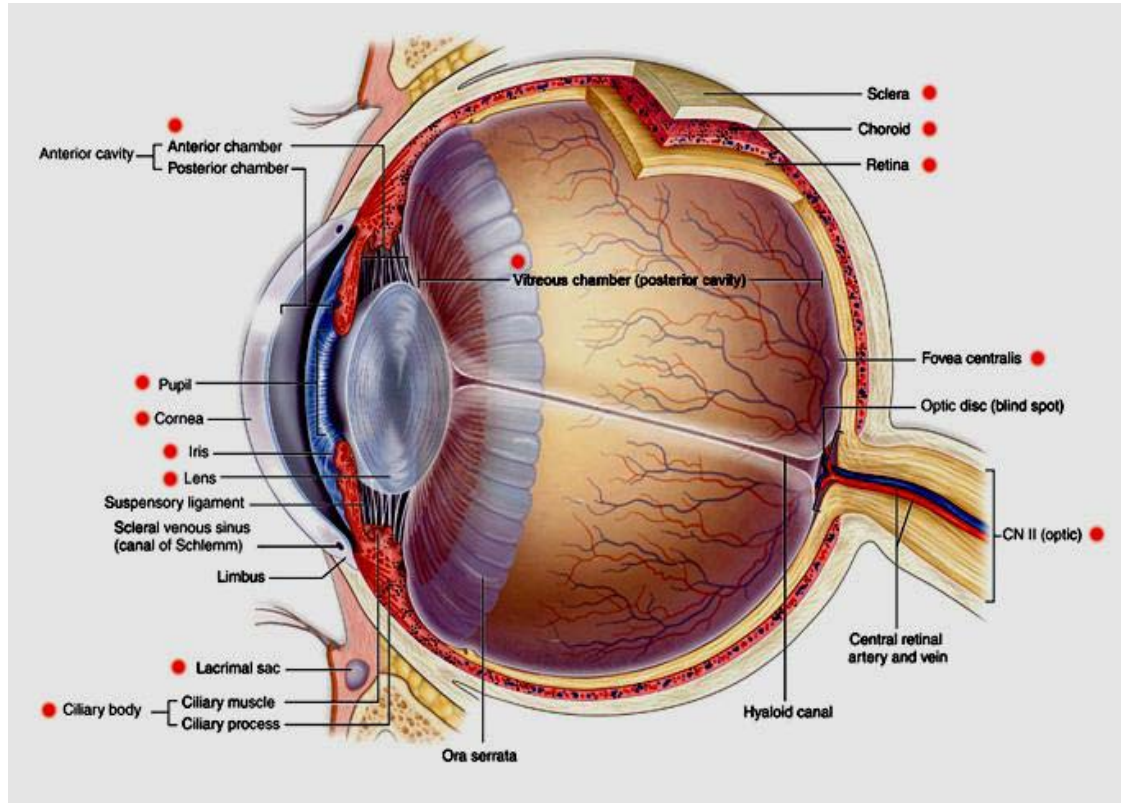
2.1.1.1 Tunica fibrosa (gözün dış tabakası) göz küresinin sağlamlığını sağlar. Bunun anterior kısmı **kornea**, posterior kısmı **sklera** adını alır. Kornea saydam, renksiz, kan damarları taşımayan bağ dokusu yapısındadır. Korneanın refraksiyon indeksi (kıırma indeksi) her tarafında aynıdır ve optik bakımdan homojendir. Tunica fibrosanın en geniş kısmı olan sklera kollajen dokudan yapılmış ve saydam değildir.

2.1.1.2 Tunica vasculosa (gözün orta tabakası), koroid, korus silier ve iris'ten meydana gelmiştir. Bu tabaka, kan damarlarından, pigment hücrelerinden ve bağ dokusundan yapılmıştır. Gözün gerisinde vasküler ve kapiller tabakalar arasında parlak ve opak bir yapı vardır, buna **tapetum lucidum** denir. Renkli olan bu yapı domuz ve insan hariç bütün evcil hayvanlarda mevcuttur. Rengi hayvan türüne göre değişir ve karanlıkta hayvanların gözlerinin parlamasını sağlar. Choroidea retina ile sklera arasındaki damar tabakasıdır. Esas görevi retinanın dış tabakasını beslemektir (Tumay, 2010).

Korus silier halka şeklinde bir yapıdır. İrisin arka uzantısıdır ve silier kası içerir. Dış pigmentli epitel kısmı retina pigment epiteli ile devam eder, iç pigmentsiz epitel kısmı ise aköz sıvıyı üretir (Tumay, 2010).

İris, corpus ciliare'den kök alan ve düz kaslardan yapılmış bir diyaframdır. Ortasındaki açıklığa **pupilla** (göz bebeği) adı verilir. İris tabakalıdır ve gözün rengi epitel hücrelerdeki pigmente bağlıdır. İrisin kas telleri düz kaslardan yapılmıştır. Kasıldıklarında gözbebeğinin çapını daraltırlar. Radyal biçimde yer almış kaslar ise kasıldıkları zaman gözbebeğinin çapını genişletirler (Tumay, 2010).

2.1.1.3 Tunica nervosa (gözün iç tabakası, retina) gözün ışığa karşı duyarlı olan sinir tabakasıdır. Retina, görme siniri (nervous opticus) ile beyne bağlıdır ve ışık reseptörleri retinanın çubukları (rod) ve konileridir (cone). Embriyoloji bakımından retina beynin bir parçası ve görme siniri de serebral traktuslardan birisi olarak kabul edilir.



Şekil 1. Gözün anatomik yapısı (Tumay, 2010)

Göz küresinin içinde humor aquous, iris, lens ve humor vitreus bulunur.

2.1.2. Humor Vitreus ve Humor Aquous

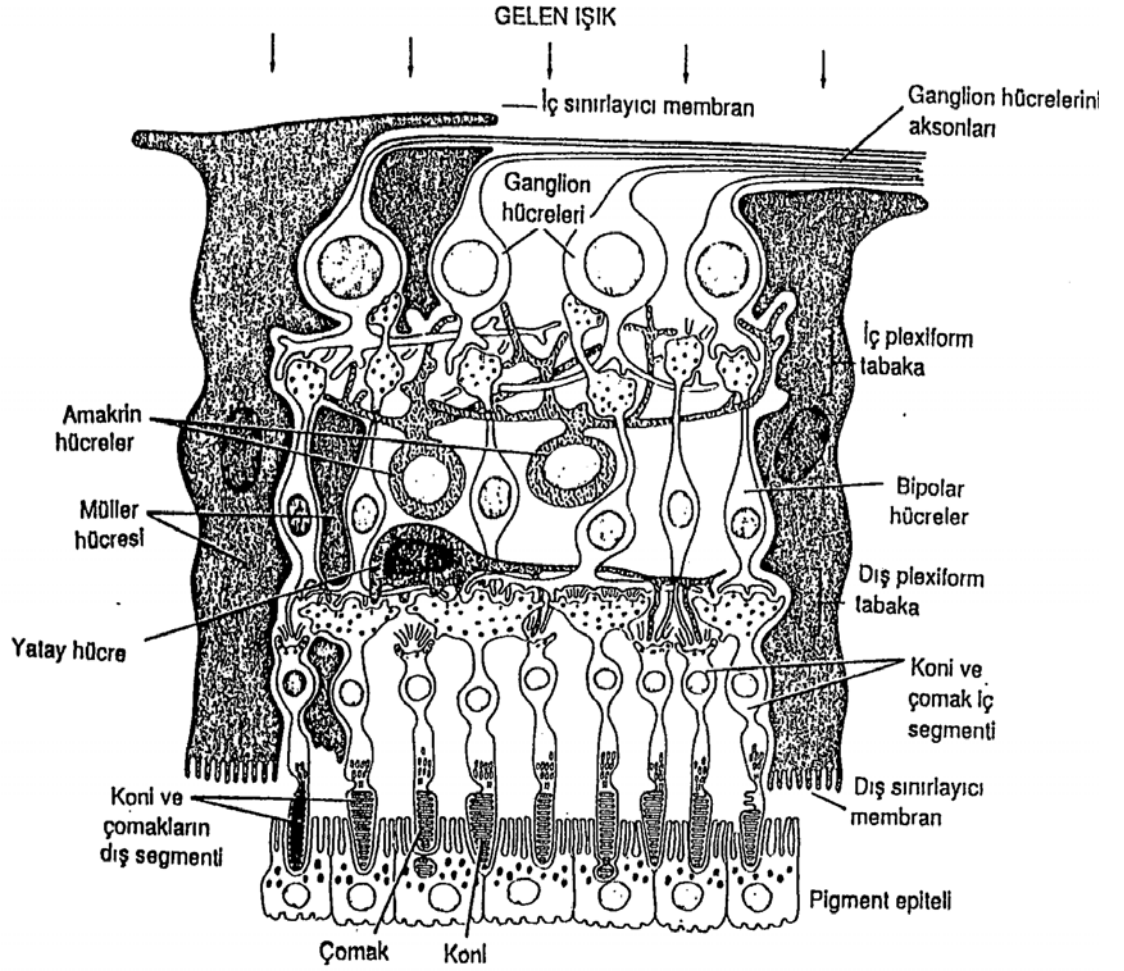
Humor Vitreus gözün en büyük hacmini oluşturur ve göz içi yapılara destek olur. Önde lens ve silier cisim, arkada retina ile sınırlıdır. Vitreus, hidrofilik bir mukopolisakkarit olan hyaluronik asit ile kollajen içeren berrak jel şeklinde bir maddedir. Taşınması difüzyon ve aktif transport yoluyla olmaktadır. Humor aquous difüzyonla mercek ve korneanın beslenmesini sağlar. Drenajı kornea ve skleranın birleşme yerinde bulunan schlemm kanalı adlı venle olur. Göz içinde belirli bir basınç vardır; buna göz içi (intraoküler) basıncı denir ve 20 (15-25) mm Hg kadardır. Bu basınç göze bir dayanıklılık verir ve göz küresinin düzgünlüğünü sağlar.

2.1.3. Retina Anatomisi

Retina önemli kimyasal ve fiziksel olayların merkezidir. Görme mekanizması bu olayların esasına dayanır (Alınak, 2008). Merkezi sinir sisteminin göz içindeki devamı kabul edilen retina, embriyoda optik kapın iç ve dış tabakalarından farklılaşmış, ince, şeffaf yapıda, ışık sinyallerinin sinirsel iletiye dönüştürüldüğü, dolayısıyla görmenin sağlanması için en gerekli ve en önemli tabakadır. Renkli görmeden sorumlu olan konileri ve esas olarak karanlıkta görmeden sorumlu olan basilleri içeren, gözün ışığa duyarlı bölümüdür. Basil ve koniler uyarıldıklarında, sinyaller retinadaki ardışık nöronlara ve sonuçta optik sinir liflerine ve buradan da beyin korteksine iletilir.

Retina, sklera ve koroidden sonra göz küresinin en içteki üçüncü katmanıdır. Optik sinirden ora serataya kadar uzanır. İçte vitre, dışta koroid ile komşudur. Retina, pigmentli retina ve saydam bir zar olan sensoriyel retinadan oluşmuştur. Pigment epitel koroide sıkıca yapışmıştır. Pigmentli retina tek katlı hücre tabakasından oluşur ve yapısında melanin bulunur. Pigment epitelindeki melanin, ışığın koroide ve göz dışına geçmesini engellemesi yanında, fotoreseptörlerdeki foto-kimyasal reaksiyonlar sonucu açığa çıkan ısıyı emerek termostat görevi de yapar. Sensoriyel retina ise mitozlar sonucu fotoreseptörler (basil ve koni hücreleri), sinyalleri basil ve konilerden bipolar hücre dentritlerine yatay olarak ileten horizontal hücreler,

sinyalleri bipolar hücrelerden gangliyon hücrelerine ileten amakrin hücreler ve destek hücreleri olan müller hücrelerinden meydana gelmiştir.



Şekil 2. Retina kanallarında bulunan hücreler (Alınak, 2008)

2.2. Oksidatif Stres

Vücuttaki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar. Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve sülfür merkezli radikaller oksidan sınıfına girer. Ancak tüm reaktif türleri radikal değildirler. Radikal olan ve olmayan reaktif türleri şekil- 3'de özetlenmiştir (Abuja, 2001 ve Word ve ark., 1996).

Reaktif Türleri	
Radikal	Radikal olmayanlar
Hidroksil ($\cdot\text{OH}$)	Peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$)
Alkoksil ($\text{L(R)O}\cdot$)	Hipoklorit (OCl)
Hidroperoksil ($\text{HOO}\cdot$)	Hidroperoksit (L(R)OOH)
Peroksil ($\text{L(R)OO}\cdot$)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Süperoksit ($\text{O}_2\cdot$)	Ozon (O_3)

Şekil 3. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri (Abuja, 2011 ; Word ve ark., 1996)

Canlı organizma için önemli olan yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücrel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogeneğinde rol oynayan serbest radikaller, atomik yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulundurarak, bağımsız olarak var olabilen moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronun kazandırdığı en önemli özellik birçok radikal ile bu elektronun paylaşılabilmesidir (Dormandy, 1983).

Serbest radikallerin en önemli tepkimeleri, moleküler oksijen ve onun reaktif türlerinin olduğu tepkimelerdir (Aslan ve ark., 1995).

Demir, bakır, mangan, molibden gibi geçiş metalleri de dış yörüngelerinde birer elektron taşımalarına rağmen radikal karakter göstermezler. Serbest radikal kabul edilen atom ve moleküller elektron dağılımlarının yanı sıra termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilir (Byung, 1994; Young, 2001). Antioksidan ise; okside olabilen substrata göre ortamda daha az derişimde bulunan ve bu substratın oksidasyonunu belirgin şekilde geciktiren veya engelleyen madde olarak tanımlanabilir. Bu tanıma göre antioksidanların fizyolojik rolü, serbest radikalleri içeren kimyasal tepkimelerin sonucunda hücresel bileşenlere gelebilecek zararı önlemektir (Barber ve ark., 1994).

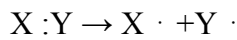
Aerobik metabolizmada denge, serbest radikal oluşumu ve bunların benzer hızla antioksidan sistemler tarafından uzaklaştırılmasıyla karakterizedir. Geri dönüşümsüz oksidatif hasarın birikimi ile önce hücre daha sonra doku ve organ sistemlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklar ortaya çıkabilir.

2.2.1. Serbest Radikaller

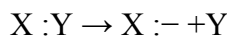
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftir. Yarı ömürleri çok kısadır. Serbest radikaller normal metabolik olaylar sırasında oluşabilecekleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler (Cheeseman ve Slater, 1993).

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler (Mccord, 1991):

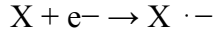
1- Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağı atomlarından birinde, diğerinde diğer atomda kalmasıyla sonuçlanan bağı kırılması.



2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı. Kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.



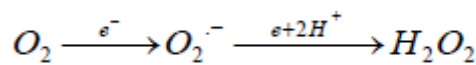
Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.

İki serbest radikalin birbiri ile reaksiyona girmesi sonucu radikal olmayan bir bileşik ortaya çıkar ve her iki serbest radikal ortadan kalkar. Bir serbest radikal, olmayan bir yapıyla reaksiyona girince başka bir serbest radikal oluşturur. Bu özellik serbest radikallerin zincir reaksiyonları oluşturabilmelerini sağlar (Bast ve ark., 1991).

2.2.1.1. Serbest Radikal Oluşumu ve Reaktif Oksijen Türleri

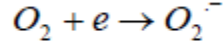
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler, oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerin iyonları ve hidroksil radikalidir. Oksijen atomu toplam sekiz elektron içerir. Bu elektronlardan dış yörüngede bulunan iki tanesi eşleşmemiştir. Moleküler oksijen (O_2), iki tane eşleşmemiş elektronu bulunduğu için kendisi de bir radikaldir. Her iki atom denge halinde olduğundan bu oksijen molekülünün reaktif bir özelliği yoktur. Bu özelliğinden dolayı oksijen, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer.

Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Mitokondriyal elektron transport zinciri tarafından gerçekleştirilen bu süreçte, %1-2 oranında moleküler oksijen kaçığı meydana gelir. Bu oksijenin redüksiyonu ile süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif ürünler açığa çıkar. Bu radikaller oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluştururlar (Brunori ve Ratiolo, 1984).



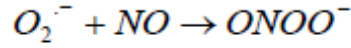
2.2.1.1.1. Süperoksit Radikali

Tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu meydana gelir.



Diğer radikallere oranla reaktivitesi çok azdır. Oluşumuna neden olduğu radikallerle birlikte organizmada genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından önemlidir (Bast ve ark., 1991).

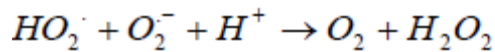
Süperoksidin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.



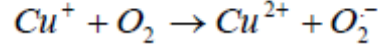
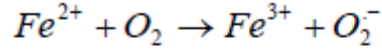
Böylece NO'nun normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO₂), hidroksil radikali (OH) ve nitronyum iyonu gibi daha başka toksik ürünlere dönüşürler.

Süperoksit, düşük pH değerlerinde daha reaktif olup oksidan perhidroksil radikali oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit anyonu hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir. Redükta olarak görev yaptığında, örneğin ferrisitokrom C'nin ya da nitroblue tetrazolium'un redüksiyonunda bir elektron kaybeder ve oksijene okside olur. Sitokrom c'yi indirgemesi Süper oksit dismutaz (SOD) tarafından inhibe edilir. Bundan faydalanılarak SOD aktivitesi ve fagositler tarafından üretilen O₂^{·-} tayini yapılır. Oksidan olarak görev yaptığında, örneğin epinefrinin oksidasyonunda bir elektron alır ve hidrojen perokside indirgenir.

Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksid meydana gelir.



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir.

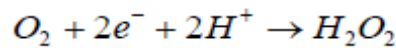
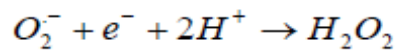


Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdürler. Bu yüzden, geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü redoks reaksiyonları olarak düşünülebilir.

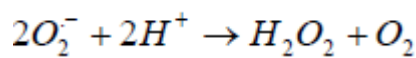
Süperoksit radikali, sülfidril gruplarının disülfidlere yükseltgenmesine ve ferrik demirin ferröz formuna indirgenerek ferritinden demirin direkt olarak ayrılmasına neden olur. Ferritin, demirin güvenli depolama formudur. Demir, süperoksit radikali ve H_2O_2 'den OH üretimini teşvik eder (Bilinski, 1989; Akkuş, 1995).

2.2.1.1.2. Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) meydana getirir. H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır (Markesbery, 1997).

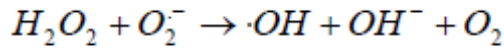


Hidrojen peroksit genellikle biyolojik sistemlerde süperoksidin dismutasyonu ile meydana gelir. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.

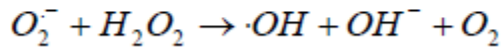
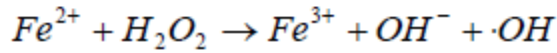
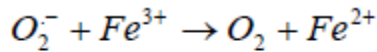


Bu dismutasyon ya spontandır ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon pH 4.8'de en hızlıdır. Bu pH'da protonlanmış ve protonlanmamış radikal konsantrasyonları eşittir. Fakat, hem protonlanmış radikalın arttığı daha asit pH'da hem de süperoksit iyonunun fazla olduğu alkali pH'da bu hız belirgin şekilde düşüktür. Süperoksidin SOD tarafından dismutasyonu ise daha geniş bir pH aralığında katalizlenir. Spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da enzimatik dismutasyon daha belirgindir (Cheeseman ve Slater, 1993; Akkuş, 1995).

Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Katalizör varlığında veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon çok yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekil ise çok hızlıdır ve fenton reaksiyonu adını alır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten OH ve OH^- üretilir.



Mitokondride bol miktarda H_2O_2 bulunur. Metal iyonları da çok olduğu için çok fazla hidroksil radikali üretimi söz konusudur. Bu metal katyonları, DNA veya hücre zarına bağlanırsa hidroksil radikali oluşumuna sebep olabilir (Reiter, 1998).

2.2.1.1.3. Hidroksil Radikali

Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve en toksik etkili olanı hidroksil radikalidir (OH). Hidroksil radikali (OH), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Yarılanma ömrü çok kısa olan bu molekül oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları hidroksil oluşumundaki en önemli reaksiyonlardır (Mccord ve Day, 1978).

Hidroksil radikali oluşunca hemen üretildiği yerin birkaç Ao uzaklığında herhangi bir molekülle reaksiyona girer. Reaktifliği yüksek olduğu için 37 °C de beklenen yarılanma ömrü 1×10^{-9} saniyedir (Karbownik ve Reiter, 2000).

Nükleer ve mitokondriyal DNA, membran lipitleri ve karbonhidratları gibi, hücrenin makro molekülleri üzerine yıkıcı etki yapmamaktadır (Halliwell, 1993; Halliwell, 1994).

2.2.1.1.4. Tekli Oksijen

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür (Akkuş, 1995). Serbest radikal olmamasına rağmen çok reaktif olması ve üretimi sırasında bazı radikal tepkimeler oluşması nedeniyle aynı aileden sayılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur.

Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle oluşur. Enerji absorpsiyonu ile uyarılan oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirerek ayrı ayrı ya da aynı orbitali işgal edebilir. Bu iki forma singlet oksijen adı verilmektedir. Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yayar (Cheeseman ve Slater, 1993).

2.2.1.1.5. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) intraselüler ve ekstraselüler ortamlarda yaygın bulunan bir sinyal molekülü olup, birçok olayın regülasyonunda, kan basıncı, kardiyovasküler, sinir sistemlerine ait fizyopatolojik mekanizmalarda, apoptozisde ve immünolojik reaksiyonlarda yer alan bir radikaldır (Kelm ve ark., 1997; Moncada ve ark., 1993).

Nitrik oksit, birer atom azot ve oksijenden oluşan atom ağırlığı 30 olan gaz yapısında küçük bir moleküldür. Lipofilik bir yapıya sahip olan NO, suda az çözünür ve membranlardan kolayca geçebilir. Dış yörüngesinde çift olmayan elektron bulunması nedeniyle serbest radikal özelliği taşıyan NO, oldukça reaktif bir maddedir. Son derece dayanıksız bir bileşik olan NO'nun dokulardaki yarı ömrü 2-30 saniyedir. Oksijen varlığında ve doku dışında yarı ömrü 4 dakikaya kadar çıkabilir. NO sentezlendikten kısa bir süre sonra serbest radikallerle reaksiyona girerek nitrit (NO₂) ve nitratlara (NO₃) dönüşürler. Bu reaksiyonlar demir gibi bazı metaller tarafından katalize edilir (Lowestein ve ark., 1994; Kiechle ve Malinski, 1993). Nitrik oksitin hızlı bir şekilde nitrit ve nitrata dönüşümü nedeniyle bunların toplamı nitrik oksit konsantrasyonunu verir.

NO'nun temel fonksiyonları şunlardır :

- Kan damarlarında vazodilatasyona yol açar.
- Trombosit agregasyonunu önler.
- Vücut savunmasıyla ilgili olarak makrofaj, nötrofil, fibroblast ve mast hücrelerinden NO salınır, sitotoksik etkilerle, bakteri, mantar ve çeşitli patojenlerin öldürülmesini sağlar.
- Santral sinir sisteminde nöronal bir habercidir.
- Nörotoksik etki gösterebilir.

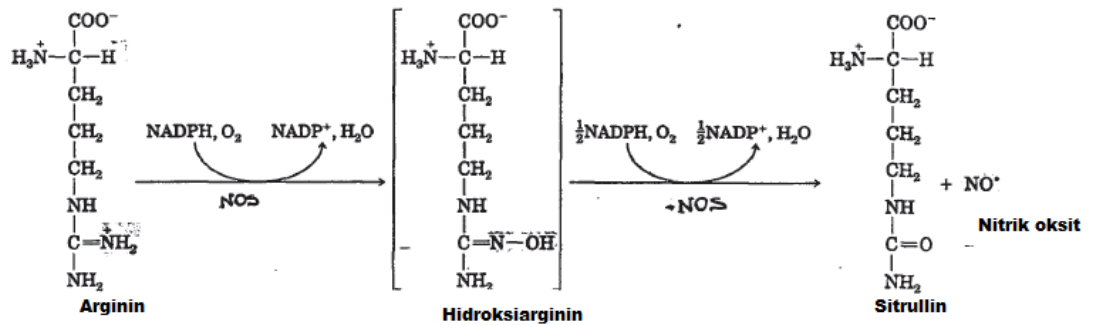
Asetilkolin, serotonin, histamin, vazopresin, insülin, klonidin, katekolamin gibi vazoaktif maddeler ve ilaçlar NO salıverilmesine neden olur. Trombosit agregasyonu sırasında aktive edilen trombositlerin salıverdiği ATP ve ADP ile pıhtılaşma sırasında oluşan trombin de NO salgılanmasına neden olur.

Bakteriler, sigara dumanı ve egzoz gazları reaktif azot oksitleri üretir. NO kararlı bir serbest radikaldir ve fizyolojik şartlar altında birçok fonksiyonda rol oynar (Simonian ve Coyle, 1996). Hücre içi konsantrasyonu fazla arttığında nöron ölümü ile sonuçlanan toksik olayları başlatır. Nitrik oksit, biyolojik sistemlerde O_2 , O^{-2} ve geçiş metalleriyle reaksiyona girer. Metal ve tiyol içeren proteinlerle yürüyen reaksiyonlar, enzim aktivitelerinde zayıflamaya neden olur.

Nitrik oksitin elektron transport zincirindeki demir içeren komplekslere saldırması, bozulmuş enerji metabolizmasıyla sonuçlanır. Nitrik oksit oluşumunun artması sinir hücreleri tahribatına yol açar (Reiter, 1998).

Nitrik oksit, oksijen ve NADH'nin bulunduğu ortamda substrat olarak L-argininden Nitrik oksit sentetaz (NOS) ile oluşur (Nelson ve Cox, 2000).

NOS enzimi FAD, Heme, Ca^{+2} , calmodulin ve 6 (R)-tetra-hidro-L biopretin (BH_4) kofaktörlerine ihtiyaç duyan bir enzimdir. Bu enzimin çeşitli formları vardır. Nöronal form (n NOS, NOS-1, Tip I) Ca^{+2} bağımlı bir enzimdir ve nöral doku ile iskelet kasında bulunur. İndüklenebilir form (i NOS, NOS-2, Tip II) sitokin veya endotoksin aktivasyonuna cevap olarak hücre ve dokudan salınır. Normal koşullar altında Ca^{+2} bağımlı değildir. Üçüncü form olan endotelial form (e NOS, NOS-3, Tip III) Ca^{+2} bağımlıdır. Nöronal formdan farklı boyut olarak daha küçük oluşur. İlk olarak vasküler endotel hücrelerinde bulunmuştur (Maxey ve Johnson, 2002). e NOS fizyolojik dozlarda toksik değil iken, Ca^{++} bağımsız indüklenebilir formu olan i NOS formu toksiktir. İskemide i NOS aracılığı ile salınan NO yüksek miktarda iken toksiktir.



Şekil 4. Nitrik oksit biyosentezi (Maxey, 2002)

NO süperoksit anyon radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrite dönüşebilmektedir. Ancak NO bir yandan süperoksit anyon radikalini temizlerken diğer yandan oluşan peroksinitrit (ONOO[•]) ve hidroksil (•OH) potent birer oksidanlardır. Peroksinitrit hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre hasarı yapmaktadır. Proteinlerde tirozin amino asitlerinin nitrasyonuna neden olarak protein yapısını bozmaktadır. Bu şekilde oluşan nitrotirozin de oksidatif stresin önemli göstergesidir (Maxey ve Johnson, 2002).

Diğer taraftan nitrik oksit ile oluşan hidroksil hücre hasar bakımından bilinen en önemli radikaldir. NO ortamdaki süperoksit (O₂[•]), lipid peroksil (LOO[•]) ve tiyol radikalleri gibi radikaller ile çok hızlı bir şekilde reaksiyona girebilmektedir. Bilindiği üzere bu radikallerin dokulardaki miktarı iskemi ve özellikle de iskemi sonrası reperfüzyon esnasında artmaktadır. Dolayısıyla bu reaksiyonun oluşum hızının reperfüzyon sonucu meydana gelen oksidatif stres ile artacağı düşünülmektedir. Bu nedenle bu çalışmaya retina dokusunda miktarı henüz tespit edilmemiş olan NO miktarının ölçümü de dahil edilmiştir.

NO etkisini cGMP yolu üzerinden göstermektedir. Ca⁺⁺ arjininden NO sentezini indükler. NO ise GTP 'den cGMP oluşumunu artırır. cGMP inaktif protein kinazları aktive eder ve düz kaslarda gevşemeye neden olur. NO oldukça kısa bir yarı ömre sahip olan NO₂ ve NO₃'e dönüşmektedir.

NO angiogenez ve hücre migrasyonu sağlar. Yarada kollajen depolanması ve kollajen çapraz bağlarını artırarak yara iyileşmesini hızlandırır. Sitokolik guanilatlar siklaz ve cGMP aracılı vasodilatasyon yapar. Endotelial lökosit hücre adezyonunu inhibe eder. Lökosit adezyon, aktivasyon ve kemotaksisinin endojen inhibitörüdür. Endotel proliferasyonu ve apoptozisi module eder. Sellüler immünomodulasyon ve bakteriyel sitotoksitesiyi artırır. Nörojenez ve fonksiyonel tamirde rol oynar ve nöronal hasardan korunmada önem taşır (Maxey ve Johnson, 2002).

NO miktarındaki artışa bağlı olarak dokularda apoptozis mekanizması başlamaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda farklı tümör olgularında nitrik oksit sentetaz (NOS) enzim sentezinde bir artışın ortaya çıktığı gözlenmiştir (Weigert ve Brune, 2008). Farelerde NOS sentezini sağlayan genin mutasyon ile bloklanması sonucunda NO'daki artışa bağlı olarak tümör gelişiminde bir hızlanma olduğu tespit

edilmiştir (Scott ve ark., 2001). Dolayısıyla dokularda NOS'deki artışın muhtemelen artan NO ürünündeki miktarla ilişkili olabileceği söz konusudur. Biyolojik dokularda NO miktarı ortamdaki O₂ ile de ilişkili olmaktadır. Örneğin beyin dokusunda NO miktarı yaklaşık 20 µM iken arteriyal kanda 150 µM olarak tespit edilmiştir (Grassi ve ark., 2005)

2.2.1.2. Serbest Radikal Kaynakları

Biyolojik sistemlerde serbest radikal oluşumu normal metabolik olayların seyri esnasında ve organizmanın çeşitli dış etkilere maruz kalmasıyla meydana gelir.

Serbest radikaller, iyonize radyasyon, stres yapıcı durumlar, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar sonucunda vücuttaki biyolojik fonksiyonların yan ürünü olarak oluşurlar (Basaga, 1990).

a- Biyolojik kaynaklar

- i. Aktive olmuş fagositler
- ii. Antineoplastik ajanlar
- iii. Radyasyon
- iv. Alışkanlık yapan maddeler; alkol ve uyuşturucu maddeler
- v. Çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler; hiperoksi, pestisitler, sigara dumanı, solventler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar)
- vi. Stres: Streste katekolamin düzeyi artar. Katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal kaynağıdır.

b) İntrasellüler kaynaklar

- i. Küçük moleküllerin otooksidasyonu
- ii. Enzimler ve proteinler; ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin
- iii. Mitokondrial elektron transportu
- iv. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri (sitokrom P-450, sitokrom b5)
- v. Peroksizomlar; oksidazlar, flavoproteinler

vi. Plazma membranı; lipoksijenaz, prostoglandin sentetaz, fagositlerde NADPH oksidaz, lipit peroksidasyonu

vii. Oksidatif stres yapıcı durumlar; iskemi, travma, intoksikasyon

Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından da büyük oranda arttırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler veya antioksidan aktiviteyi düşürürler.

Bu tip maddeler dört grupta toplanabilirler;

i. Toksinin kendisi bir serbest radikaldir. Kirli havanın koyu rengini veren azotdioksit gazı örnek olarak verilebilir. Bu radikal iyi bir lipit peroksidasyon başlatıcısıdır.

ii. Toksin bir serbest radikale metabolize olur. Mesela, toksik bir madde olan karbontetraklorür karaciğerde sitokrom P-450 tarafından triklorometil serbest radikale dönüşür. Bu radikalın oksijenle reaksiyonu sonucu meydana gelen peroksil radikali de kuvvetli bir lipit peroksidasyonu başlatıcısıdır. Böylece, reaktif serbest radikal üretimi, karaciğerde antioksidan savunmaları aşar. Bu da hücre membranlarının oksidatif yıkımı ve ciddi doku hasarı ile sonuçlanır.

iii. Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir.

Bunun tipik bir örneği paraquatdır. Özellikle karaciğerde biriken paraquat, bir serbest radikale indirgendikten sonra tekrar yükseltgenerek rejenere edilirken beraberinde oksijen indirgenir. Böylece bol miktarda süperoksit üretilmiş olur.

iv. Toksin antioksidan aktiviteyi düşürür. Mesela parasetamolün karaciğerde sitokrom P-450 tarafından metabolizması glutatyonla reaksiyona giren ve miktarını azaltan bir ürün meydana getirir.

Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki önemleri lipit peroksidasyonundaki etkileridir. Geçiş metalleri lipit peroksidasyonunu başlatmaktan ziyade sentezlenmiş olan lipit hidroperoksitlerinin parçalanmalarını ve lipit peroksidasyonun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece zararlı olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler (Akkuş, 1995).

2.2.1.3. Serbest Radikallerin Etkileri

2.2.1.3.1. Membran lipidlerine etkileri

Hücre membranı, bol miktarda doymamış yağ asidi içerdiğinden serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır. Ortamda bulunan serbest radikaller yağ asitlerinden bir proton kopararak “Lipid peroksidasyon” olarak bilinen reaksiyonun başlamasına neden olurlar. Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri gibi maddeler hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek hücrenel ve metabolik fonksiyonlar üzerine toksik etki gösterirler (Köse ve Doğan, 1992).

Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistin gibi amino asitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran geçirgenliğinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (Köse ve Doğan, 1992). Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. MDA, membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açarak iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey determinantlarının bazı özelliklerini değiştirmektedir. Bu özelliklerinden dolayı MDA; mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (Köse ve Doğan, 1992).

2.2.1.3.2 Proteinlere etkileri

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin, özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Protein fonksiyonu için kritik pozisyonda olan aminoasitler (örneğin enzimin aktif bölgesindeki amino asitler), özellikle radikal hasarına duyarlıdır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril (-SH) grubu bulunduran amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler, oksidasyona en fazla maruz kalanlardır. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını

etkilemektedir. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır. Bunun yanı sıra iskemi-reperfüzyon sürecinde hücre içi enzimlerden olan antioksidan enzimlerin oksidasyonları da bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın nedenlerinden birini oluşturabilmektedir (İşlekel ve ark., 2000).

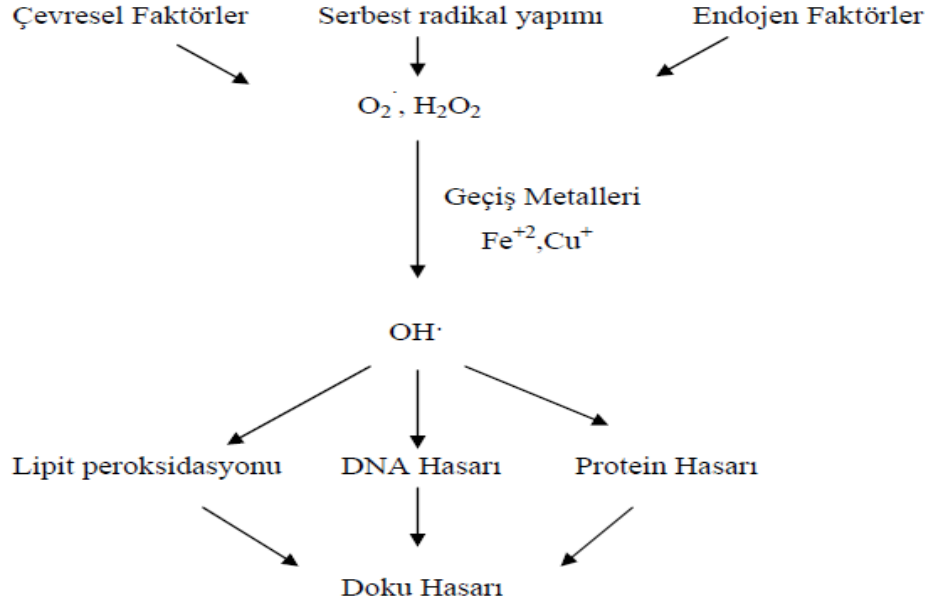
2.2.1.3.3. Karbohidratlara etkileri

Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzaloaldehyitler meydana gelir. Okzaloaldehyitler, DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturabilme özelliğinden dolayı antimitotik etki gösterirler (Akkuş, 1995). Karbohidratların proteinlere bağlanması, proteinleri serbest radikal hasarına daha duyarlı kılmaktadır. Böylece hormonal ve nörotransmitter yanıtlarda rol oynayan hücre reseptör işlevleri değişmektedir (Aybey ve ark., 1996; Winrow ve ark., 1993). Bir mukopolisakkarit olan hyalüronoik asit gözün vitreusunda bol miktarda bulunur. Hyalüronoik asidin oksidasyonu katarakt oluşumuna katkıda bulunur (Akkuş, 1995).

2.2.1.3.4. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

DNA yapısında oksidatif hasara sebep olan pek çok faktör vardır. İyonize radyasyon, artmış oksijen konsantrasyonu, ksantin oksidaz ve çeşitli kimyasallar aşırı radikal oluşumuna neden olarak direkt hasara yol açarlar. Bazı serbest radikaller de DNA tamir enzimlerini etkileyerek hasara yol açarlar. İyonize radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede değişime ve ölüme yol açarlar. DNA yapısındaki pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma ve yıkım sonuçta DNA'nın denatürasyonuna neden olur. Oksidatif hasar DNA kırıkları, baz çifti değişimleri, yeniden düzenlenme gibi yapısal değişimlere neden olmaktadır. DNA, serbest

radikallerden kolaylıkla zarar görebilen önemli bir hedef moleküldür (Winrow, 1993; Halliwell, 1994).



Şekil 5. Vücuttaki önemli serbest radikaller ve oluşturdukları hasarlar (Halliwell, 1994)

2.2.1.4 Göz ve Serbest Radikaller

Göz, aşırı miktarda serbest radikal etkisine maruz kalan bir organdır. Çünkü retina oksijen bakımından zengin olup büyük miktarda doymamış yağ asidi içerir. Retina pigment epiteli (RPE) hücreleri sürekli olarak her gün bir çok fotoreseptör dış segmentini parçalamakta ve fagosite etmektedir. RPE lokalizasyonu, fotik reaksiyonlar ve koriokapillaristen difüze olan yüksek parsiyal oksijen (PO₂) seviyesi ve buradaki yüksek metabolik aktivite sonucu serbest radikal üretimi ve bunların etkisine maruz kalma riski artmaktadır (Braquet ve Doly, 1986; Yeh ve Ashton, 1990).

Göz bu radikallerin etkisine yatkın olduğu gibi yeterli miktarda antioksidan savunma sistemlerine de sahiptir.

2.3 İskemi

İskemi kelimesi, Yunanca "iskho" yani geri alınma ile "haima" yani kan kelimelerinin birleşiminden meydana getirilerek ilk defa Virchow tarafından tıp literatürüne kazandırılmıştır. İskemi, bir dokuya kan akımının yetersizliğini ve hücrel enerji ihtiyacının karşılanmasındaki yetersizliği ifade eden patolojik bir durumdur.

İskemi, dokuları üç ihtiyacından yoksun bırakır:

- 1) Oksijen
- 2) Metabolik substratlar
- 3) Artık ürünlerin uzaklaştırılması.

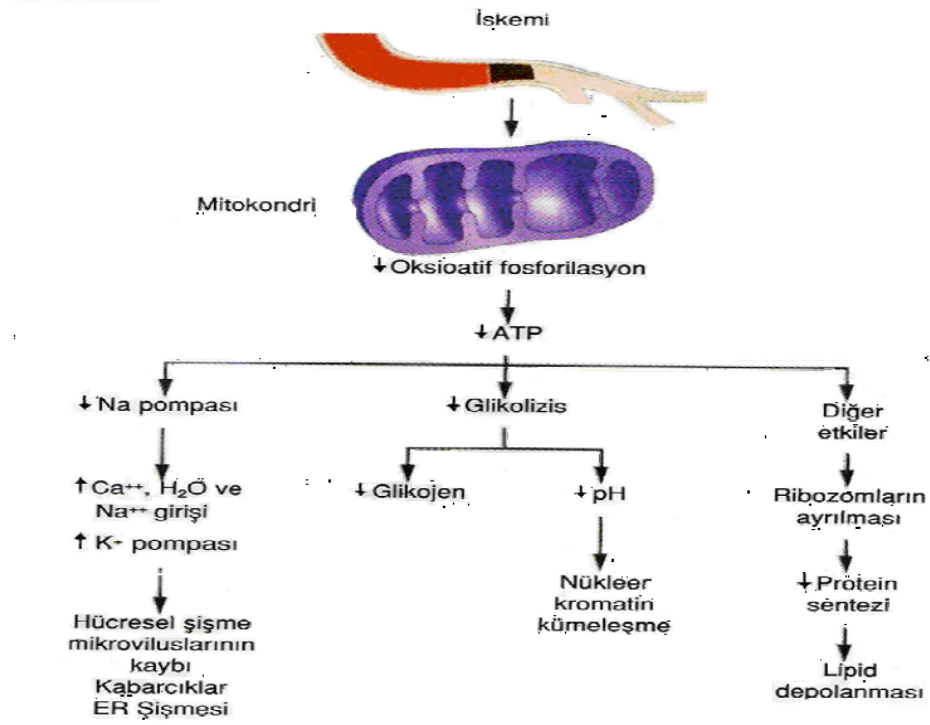
Bu ihtiyaçların giderilememesi hemostatik cevabı azaltacak ve zamanla doku hasarını artıracaktır. Eğer bu durum uzun sürerse doku ölecektir (İnfarktüs).

Hücrel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (Nayak ve ark., 1993).

İskemiye direnç farklı dokularda değişkenlik gösterir. İskelet kası saatlerce iskemiye maruz kalsa bile normale dönebilirken, nöronlar birkaç dakikada geri dönüşümsüz hasara uğrayabilirler (Nayak ve ark., 1993). Homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP sentezinin azalması (ya mitokondrial oksidatif fosforilasyon ya da anaerobik glikoliz yolu ile) intrasellüler metabolit birikmesine ve

hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar (Augustin ve ark., 1988; Osborne ve ark., 2004).

Öncelikle enerji gerektiren Na-K pompası etkilenirken, Na⁺ iyonları intrasellüler alana geçer ve komşu intertisyel boşlukta osmotik dengeyi sağlamak için bereberinde su çeker. Bunun sonucunda K⁺ iyonları intrasellüler alandan, ekstrasellüler alana kaçar. Bu değişikliklere mitokondriyal fosfolipaz inaktivasyonu eşlik eder ve oksidatif fosforilasyon kaybı ortaya çıkar böylece adenozin trifosfat (ATP) üretimi durma noktasına gelir. İskemik hasara karşı gelişen erken fazdaki bu değişiklikler zedeleyici ajan ortadan kaldırılmazsa irreversible hücre hasarı meydana gelir (Şekil 6). Kalsiyum iyon dengesi bozulur, hücre dışı Ca⁺⁺ plazma membranından içeriye akışı artarak stoplazmada birikir. Bu olaylar sonucunda sırasıyla mitokondriyal hasar, lizozomlarda şişme, endoplazmik retikulumun dilatasyonu, enzim ve protein kaybı, hücresel kompartmanların bozulması ve otoliz meydana gelir. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder (Chun ve ark., 2004).



Şekil 6. İskemi hasarı (Osborne, 2004)

İskemi hasarı, bir dokuyu besleyen arteriyal sistemin belli bir zaman dilimi içinde tıkanması sonucunda ortaya çıkan durumdur. İskemi olmuş dokuda kan akımının yeniden sağlanmasına reperfüzyon denilmektedir. Reperfüzyon hasarı ise, doku kan akımı yeniden sağlandığında ortaya çıkan hasara verilen addır. İskemi kritik bir zaman dilimini aşarsa dokularda ardışık birtakım kimyasal olaylar oluşmakta ve bu olaylar hücre disfonksiyonu, interstisyel ödem, hücresel hasar ve en sonunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemi hasarının giderilmesi için, bu kritik zaman diliminde dokunun tekrar oksijene olması şarttır. Ancak, reperfüzyon sırasında oksijen serbest radikallerinin rol oynadığı reperfüzyon hasarı oluşur.

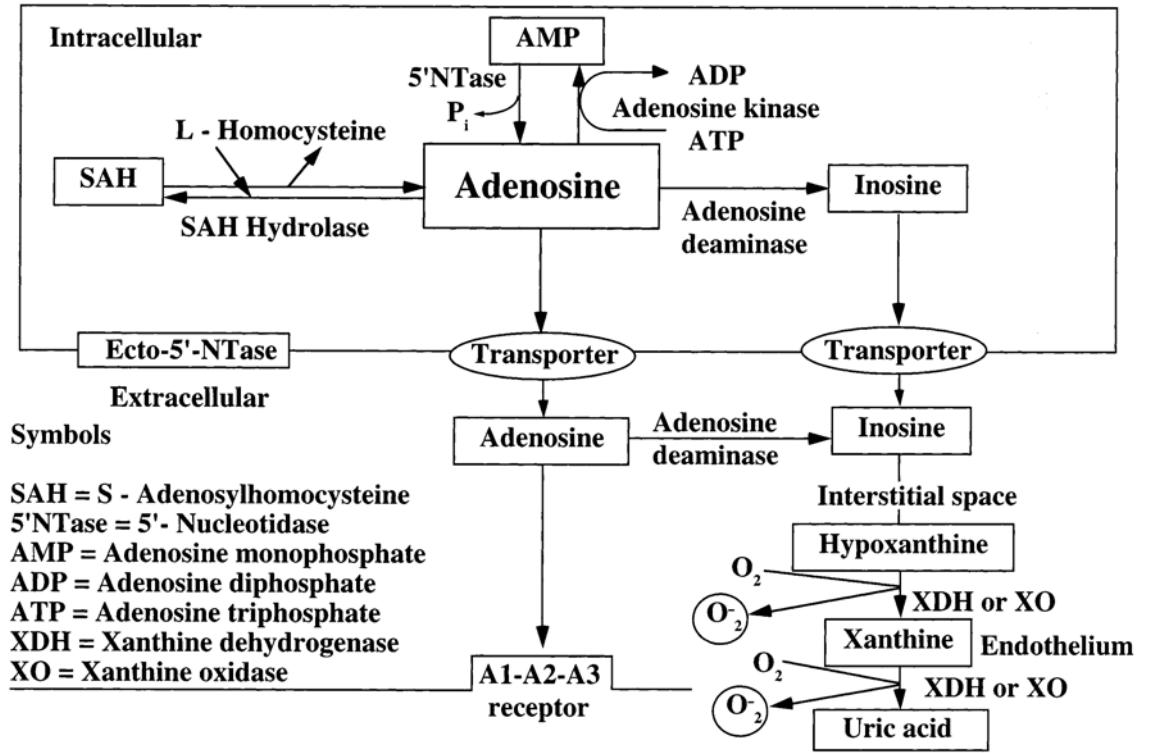
İskemik dokudaki hasarın sadece iskemi tarafından oluşturulduğu düşünülürken, son yıllardaki çalışmalar reperfüzyonun da bu hasarda önemli bir rol aldığını göstermiştir.

İskemi, anoksi (tamamen oksijen yokluğu) ve hipoksi (oksijen azlığı) ile karıştırılmamalıdır; çünkü iskemi her zaman hipoksi ve anoksi komponentleri ile

birlikte görülmektedir ancak hipoksi ve anoksi her zaman iskemiye kapsamamaktadır.

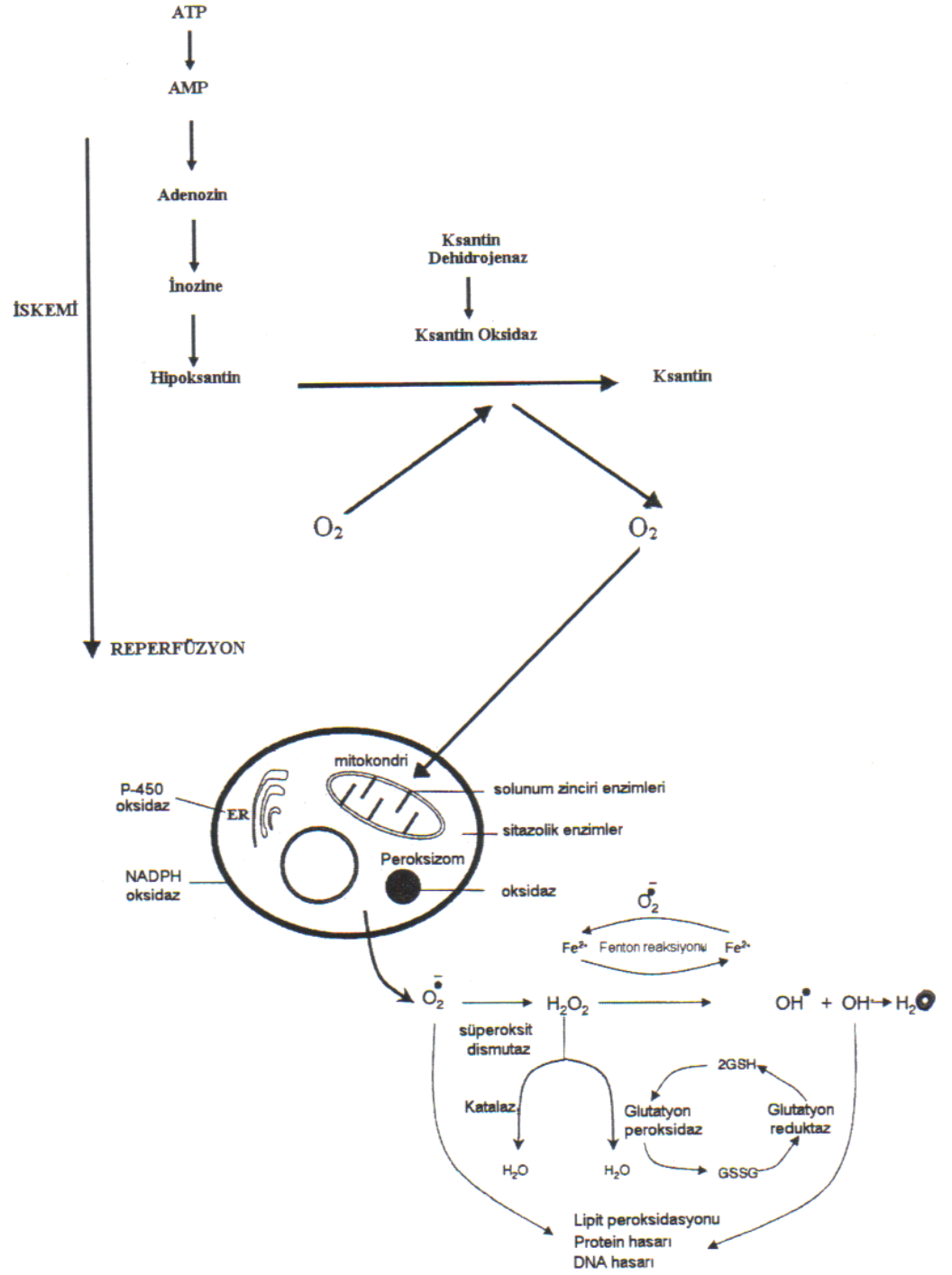
Hipokside ilk etkilenen mitokondrial oksidatif fosforilasyonla sağlanan hücrenin aerobik solunumudur. Bu esnada, adenosin trifosfat (ATP) yapımı yavaşlamakta ya da durmaktadır. Bu durum sodyum pompası yetersizliğine neden olacak şekilde ATP az aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır. İyon tutulumuna izo-ozmotik su birikimi eşlik ederek akut hücrel şişme meydana gelmektedir.

Hücrede ATP azalınca adenosin monofosfat (AMP) birikmekte, bu da anaerobik glikoliz ile glikojenden ATP sentezini artırarak hücreye enerji sağlamaktadır. Glikolizis laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine yol açmakta ve bu durum hücre içi pH'ı düşürmektedir. Bunu izleyen süreçte, granüler endoplazmik retikulumdan ribozomların ayrılması ve polizomların bozulmasıyla monozomlar oluşmaktadır. Hipoksi devam ederse, membran geçirgenliği azalmakta ve sonuçta hücre yüzeyinde yerel şişkinlikler oluşmaktadır. İskeminin başlamasıyla birlikte hücrenin aerobik solunumu etkilenmekte ve doku hücrel ATP düzeyinde azalma olmaktadır. ATP yıkımı sonunda hipoksantin ve ksantin gibi pürin metabolitleri birikmekte ve bir ön enzim olan ksantin dehidrogenaz enzimi, ksantin oksidaza dönüşmektedir.



Şekil 7. Adenozin üretimi (Roth ve ark., 2003)

Bu nedenle reperfüzyon esnasında sistemde açığa çıkan aşırı oksijen nedeniyle endoplazmik retikulum, mitokondri, plazma membranı ve sitosolde aşırı süperoksid anyonu (O_2^-) üretilmektedir. Süperoksid anyonunun oluşması ile zincirleme reaksiyonlar başlamakta ve endotel hücrelerinde diğer oksijen radikalleri ile birlikte hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmaktadır. Daha sonra H_2O_2 , Fe^{+3} in Fe^{+2} ye dönüştürmekte ve süperoksit anyonları tarafından katalizlenen fenton reaksiyonu ile OH^- anyonuna dönüşmektedir. Başlıca antioksidan enzimler süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazdır. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, protein ve DNA hasarına neden olmaktadır. Ayrıca anaerobik metabolizma sonucunda laktik asit oluşmakta, hücre membranı boyunca iyon gradienti kaybı ile hücrel mekanizmalar hasara uğramaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. İskemi-reperfüzyon sonrasında meydana gelen süperoksit radikalleri ve doku hasarı (Osborne ve ark., 2004)

İskemi döneminde tekrar doku kan akımı sağlanırsa doku hasarı geri dönüşümlü olmakta, iskeminin devam etmesi halinde geri dönüşümsüz zedelenme oluşmaktadır. Geri dönüşümsüz zedelenme sonucu mitokondrilerde ileri derecede vakuolizasyon, hücre zarlarında aşırı yıkım, lizozomlarda şişme görülmektedir.

Retina, diensefalonun bir uzantısı olarak beyin ile birçok fonksiyonel ve yapısal benzerlikler içermektedir. Beyin ile karşılaştırıldığında retinanın kendine has ve özellikli çevresel yapısı ile iskemik hasara anlamlı bir şekilde doğal bir direncinin bulunduğu görülmektedir. Retinanın iskemiye gösterdiği rölatif direnç beyin ile retina arasındaki en göze çarpıcı farktır. Nöroproteksiyona dayalı tedavi stratejileri beyin iskemilerinde hayal kırıklığına uğraticı sonuçlar vermiştir. Beyin birkaç dakikalık iskemiye çok geniş bir hasar veya ölümlerle cevap verebilirken retina 60 dakikalık iskemiye hasarsız yanıt verebilir. Retinada, hemoglobin ve miyogloblin ile uzaktan ilişkili, nörona özel solunumsal bir protein olan nörogloblin yüksek seviyelerde bulunmaktadır. Beyindeki 100 katı kadar olan bu protein retinada özellikle fotoreseptörlere yerleşmiştir. Retinanın iskemik modellerinde fotoreseptörlerde, iç retinaya oranla daha az fonksiyonel ve yapısal hasar görülmesinin nedeni henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır. Ancak bu gerçeğin üç temel nedene dayandığı düşünülmektedir.

1. Lokal enerji substratları mevcuttur (Vitreusda önemli miktarlarda glukoz, retinada glikojen deposu vardır).
2. Bu enerji substratları retinal iskemi periyodu boyunca boşalmaktadır.
3. İzole retina oksijen yokluğunda bile glukolizis ile glukozdan ATP sentezleyebilir(Tumay, 2010).

Retinal iskeminin karışık patofizyolojisi retina ve vasküler desteği arasındaki dinamik ilişki ile alakalıdır. Koroid, retina ve optik sinir başı kan akımlarının tek tek veya hepsinin birden etkilenmesi retinada değişik patolojik durumlara yol açacaktır. Kan akımı kesildiğinde retinadaki değişik hücre tipleri farklı şekillerde bu durumdan etkilenecektir.

2.3.1 Geri Dönüşümlü Zedelenme

Hipoksi, öncelikle mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyonu etkileyerek, ATP ve fosfokreatin depolarında azalmaya neden olur. Mevcut ATP sırasıyla adenzindifosfat, adenzinmonofosfat, inozin ve hipoksantin'e yıkılır. Oluşan ve biriken bu metabolitler fosfofruktokinaz enzimini uyararak hücre metabolizmasının anaerobik yöne kaymasına neden olur. Bu metabolik değişim, daha fazla glikojen kullanımı ancak daha az ATP üretimi (aerobik solunumla elde edilen miktarın yaklaşık %70'i) ile sonuçlanır (Brunori ve Rattilio, 1984). Dolayısıyla doku glikojen depoları hızla tükenir. İskeminin devam etmesi, hipoksantin ve anaerobik glikoliz ürünlerinin (laktik asit, hidrojen iyonu, inorganik fosfatlar) hücre içinde birikimi, asidozda artış ve dolayısıyla enzim ve protein hasarıyla sonuçlanır.

ATP depolarındaki azalma, ATP bağımlı hücre zarı pompalarında fonksiyon bozukluğuna neden olarak, hücre dışı potasyum kaybı ve hücre içi ani sodyum kalsiyum- klorür artışına ikincil hücre şişmeyle sonuçlanır. Bu hidropik değişiklik, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleotidleri gibi metabolitlerin birikimi sonucu artan osmotik yükü daha da belirginleştirir. Hücre şişme, makroskopik olarak organ renginde solma ve ağırlığında artışla, mikroskopik olarak ise sitoplazmada berrak vakuoller oluşumuyla (hidropik değişiklik/vakuoler dejenerasyon) kendini gösterir (Bast ve ark., 1991).

Sonrasında, ribozomların granüllü endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomlardan monozomların oluşumu ile protein sentezinde azalma oluşur. Hipoksi düzelmez ise mitokondri fonksiyonunda kötüleşme ve membran geçirgenliğinde artışa bağlı hücre şişme ve fosfolipidden zengin dansiteler ile karakterize morfolojik bozulma görülür.

Hücre iskelet; mikrovillus gibi yapısal özelliklerin kaybı, hücreler arasındaki bağların gevşemesi ve hücre yüzeyinde kabarcıkların oluşumu ile bozulur. Hücre çekirdeği granüler ve fibriller elemanlarında dağılma meydana gelir. Osmotik regülasyon kaybı sonucunda mitokondri, endoplazmik retikulum ve hemen hemen tüm hücre organellerinde hidropik değişiklikler oluşur (Bast ve ark., 1991).

Doku iskemisi sırasında başka birçok mekanizma daha aktive olur. Nükleer faktör-kappaB (NF-κB) aktivasyonu, iltihabi araçların ve adezyon moleküllerinin

(özellikle ICAM-1 ve E-selektin) sentezinde artış olur. Adezyon moleküllerindeki bu artış, iltihabi-iskemik alan lökosit adezyonunu artırır. Oksijen NO sentezi için de gerekli olup, iskemik dokuda NO seviyesinde azalma görülür. Bunlara ek olarak kompleman sistem aktivasyonu ve platelet aktive edici faktör (PAF) sentez artışı gerçekleşir. Dolayısıyla iskemi, dokuyu reperfüzyon hasarına karşı daha hassas bir duruma getirir. Eğer doku perfüzyonu düzelirse tüm bu değişimler geri dönüşümlü olup iskeminin devamı durumunda geri dönüşümsüz zedelenme ile sonuçlanır.

2.3.2 Geri Dönüşümsüz Zedelenme

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürebildiği maksimum iskemi süresi olarak tarif edilir. Ortalama kritik iskemi süresi ise %50 doku kaybına neden olan iskemik zaman dönemidir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır (Mccord, 1985). Hipoksi sonucunda gelişen mitokondri fonksiyon bozukluğu (oksidatif fosforilasyon yetersizliğine bağlı ATP depolarında azalma) ve hücre zarı hasarının doku oksijenasyonunun yeniden sağlanmasına rağmen düzeltilememesi geri dönüşümsüz hasarın en önemli göstergesidir. Bu dönemde mitokondriyal vakuolizasyon artışı ve matriks içi kalsiyumdan zengin yoğunluk birikimi oluşur. Hücresel zarların tümünde gerçekleşen hasar; hücre organelleri ve hücrede şişme, protein, esansiyel koenzim ve ribonükleik asit kaybı, ATP sentezinde kullanılan metabolitlerin depolanamamasına bağlı yüksek enerjili fosfat depolarında azalma ve interstisyel alandaki makromoleküllerin hücre içine geçişiyle sonuçlanır. Lizozomal membran hasarı enzimlerin sitoplazma içine sızmasına yol açar.

Asit hidrolazlar, düşük sitoplazmik pH'da, tüm hücresel elemanların enzimatik yıkımına neden olurlar. Lizozomal sindirim, hücre ölümü sonrası, interstisyel alanda dahi devam eder. Sonrasında ölü hücreler fosfolipid kitleler şekline dönerek myelin şekilleri olarak tanımlanırlar. Bu fosfolipid kitleler yağ asitlerine parçalanır veya fagositoza uğrayarak ortadan uzaklaştırılır. Oluşmuş yağ asitlerinin kalsifikasyonu ise kalsiyum sabunlarının oluşumuyla sonuçlanır.

Hücrelere has proteinlerin hücre zarı hasarı veya hücre ölümüyle sistemik dolaşıma geçmesi ve bunların kan serum örneklerinde gösterilmesi spesifik doku hasarı tespitinde önemlidir. Örneğin, myokard infarktüsü tanı ve takibinde myokard dokusuna özgü kreatin kinaz ve troponin izoformu ölçümleri önemlidir.

2.3.2.1 Geri Dönüşümsüz Zedelenme Mekanizmaları:

i) Membran fosfolipid kaybı: Hücre zarı membran fosfolipidleri, hem yıkım artışı (artmış hücre içi kalsiyum ile aktive olmuş fosfolipazlar) hem de sentez azalması (ATP bağımlı reaçilasyon ve sentez azalması) sonucunda azalır.

ii) Hücre iskelet anormallikleri: Hücre zarının iskeletten ayrılıp yırtılması, artmış hücre içi kalsiyum ile aktifleşen proteazlar ve hücre şişmesi sonucu oluşur.

iii) Toksik oksijen radikalleri

iv) Lipid yıkım ürünleri

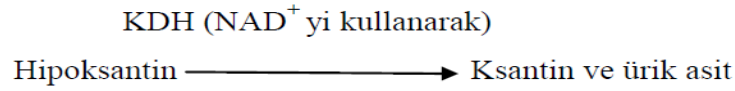
Bu zedelenme mekanizmalarıyla 4 ana sistem olan hücre zarı bütünlüğü, oksidatif fosforilasyon, protein sentezi ve hücrenin genetik yapısı etkilenir. Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinin en önemli unsuru artmış hücre zarı geçirgenliği olup hacim regülasyon bozukluğu, hücre içi ve dışına makromoleküllerin artmış hareketi ve hücre zarı yapısal bozukluğuna neden olur (Miller, 1984). Fosfolipid yıkım ürünleri membran üzerinde deterjan etkisi yaparlar. Bozulmuş oksidatif fosforilasyon ve azalmış hücre içi ATP depolarına bağlı gelişen membran iyon pompa disfonksiyonu hücre içi kalsiyum miktarında ani yükselişe neden olur. Bu yükselişe organellerden salınan kalsiyum da katkıda bulunur. Artmış hücre içi kalsiyum birçok enzimatik sistemde [fosfolipazlar (membran hasarı), proteazlar(membran ve hücre iskeleti hasarı), ATPazlar (ATP yıkımı) ve endonükleazlar (kromatin yıkımı)] aktivasyon oluşturur (Newel, 1986).

Hücresel fonksiyonlar hücre ölümünden önce kaybolur. Hasarın morfolojik görünümü, kritik biyokimyasal sistemlerde bozukluklar oluşup geri dönüşümsüz hasar oturduktan çok sonra belirgin hale gelir. Hücre şişmesi dakikalar içinde

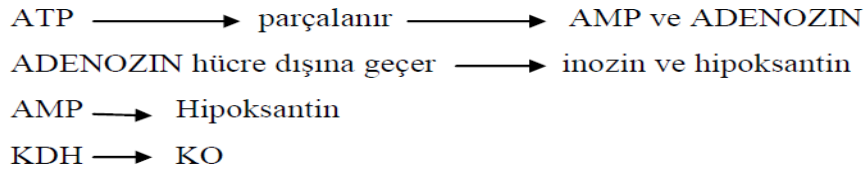
görülebilir geri dönüşümlü bir hasardır. Geri dönüşümsüz hasar 20-60 dakika içinde ışık mikroskopunda görülebilirken, hücre ölümü ancak 10-12 saatte belirgin hale gelir.

Özet olarak

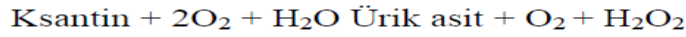
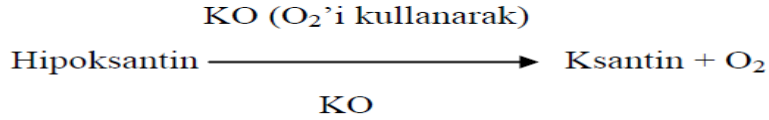
Normal şartlarda;



İskemide,



Reperfüzyon ile,



2.3.3. Serbest radikallerin iskemideki rolü

Glutamat ve glukoz/oksijen yetersizliğinden kaynaklanan birçok serbest radikal oluşum yolu vardır (Pellegrini Giampietro ve ark., 1990) ve serbest radikaller, retinal iskemideki hasarın önemli nedenidir (Bonne ve ark., 1998). İskemi sonrasındaki reperfüzyon hasarı düzensiz bir yol izler, fakat iskemi sırasında ortamda mevcut olan bileşikler tükendiğinde, genel olarak oksijenden kaynaklanan veya diğer serbest radikaller oluşur (Osborne ve ark., 2004).

Serbest radikaller iskemi-reperfüzyon sırasında birçok yolla oluşabilmektedir. Reperfüzyonun erken safhalarında olduğu düşünülen süperoksit radikalleri ($O_2^{\cdot-}$) ortamda daha baskın bir şekilde bulunur. İskemi sırasındaki ATP degradasyonu, hipoksantin oluşmasına ve sinirlerdeki hücre içi kalsiyum miktarının artmasına neden olur. Böylece Ca^{+2} bağımsız bir protein olan kalpaini aktive eder. Kalpain, ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. Ksantin oksidaz da birikmiş hipoksantini ürik asite okside eder, ürik asit ise $O_2^{\cdot-}$ 'nin serbest kalmasına neden olur. Bu iki molekül Haber-Weiss meknizması ile reaksiyona girerek çok toksik olan hidroksil radikalini ($\cdot OH$) oluşturur (Barry ve Grace, 1997).

Ayrıca, süperoksit radikali, iskemi sırasında çok fazla miktarda bulunan nitrik oksitle etkileşime girer, bu etkileşim sonucu nitrosil radikali olan peroksinitrit ve sonunda da hidroksil radikali oluşur (Chan, 1996). Glial hücrelerin ve ortama sızan lökositlerin aktivasyonu sonucu, iskemi sonrasındaki radikallerin oluşumunda önemli rolü olan sitokinler, nitrik oksit ve araşidik asit gibi inflamasyon yönlendiricileri serbest kalır (Osborne ve ark., 2004).

2.3.3.1. İ/R Hasarına Karşı Oluşan Savunma Mekanizmaları

Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Antioksidan olarak da adlandırılan bu savunma mekanizmalarının etkileri dört ayrı şekilde olur;

- 1) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması onarıcı etkidir.
- 2) SOR'ni bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
- 3) SOR'yle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- 4) SOR'ni etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

2.3.3.1.1 Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar;

Süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, Hidroperoksidaz.

Enzim olmayan endojen antioksidanlar;

Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Miyogloblin, Hemogloblin, Ferritin, Bilirubin, Glutatyon, Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin

2.3.3.1.2 Eksojen Antioksidanlar

Vitamin olan eksojen antioksidanlar:

α -tokoferol (vitamin E), β - karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asit (folat).

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar:

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenyline iodonium), rekombinant süperoksit dismutaz, trolox-C (vitamin E analogu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin), nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1), barbitüratlar, demir şelatörleri.

2.4. Apoptozis

Apoptoz, eski Yunanca “APO” (ayrı) ve “PTOZIS” (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından ‘sonbaharda yaprak dökümünü’ tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terk etmesi ve arkadan gelen hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, Klasik Yunan tarihçisi James Cormack’ın önerisiyle “apoptoz” olarak adlandırılmıştır (Cummings ve ark., 1997).

Her hücre, doğar, büyür, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Erdoğan, 2003; Hıkım ve ark., 1995). Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol aldığı gösterilmiştir (Mcphie ve ark., 2003). Örneğin; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogenezisde rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr, 1994).

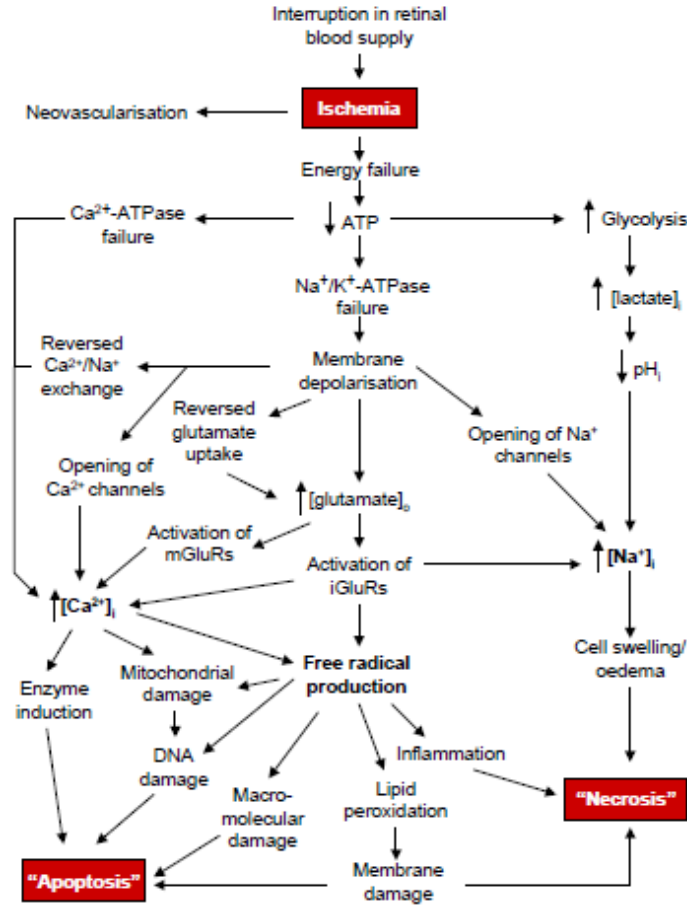
Apoptozis, programlanmış hücre ölümü, organizmada fizyolojik süreçlerin yanı sıra çeşitli patolojilerin ortaya çıkışındaki mekanizmalarda da rol oynamaktadır. Tek bir hücre, çoğalarak çok hücreli organizmaya dönüşürken organizma için zararlı olabilecek bir takım mutasyonlu hücreler ve yanlış yere yerleşen hücrelerin yok edilmesi gerekir. Bu işlem için bir program dahilinde sinyaller devreye girer. Kansere, diyabet, AIDS, iskemi gibi hastalıkların başlangıcında apoptozis sonucu aşırı vezikül artışı olduğundan immün sistem bunları yok etmede yetersiz kalabilir ve sonuçta apoptozis mekanizması belli bir aşamadan sonra işleyemez hale gelir. Böylece patolojik durumlar ortaya çıkar (Dilsiz, 2009).

Apoptozisin düzenli olmadığı durumlarda tümörögenenezis ve sonuçta kanser oluşur. Ayrıca enfeksiyon ajanı bir kısım virüsler apoptozisi engelleyerek etkili olurlar. Deneysel çalışmalarda nitrik oksit (NO) ilave edildiği ortamlarda hücrede apoptozisin engellendiği görülmüştür (Dilsiz, 2009).

2.4.1. Apoptozisde Hücre Morfolojisi

Apoptoz, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine, dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak yangısal değişiklikler yoktur. Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde mikst kondens bir yapıda olup daha diffüz görünümündedir. Apoptoziste süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180–200 baz çifti (bp) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır. İmmüno elektroforez yapıldığında “ladder patern” olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (Gavrieli, 1992). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptoziste yaklaşık 300 000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz.

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler, etrafında açık bir halo ile görülmektedir Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Hücre henüz yaşamaya devam etmektedir.



Şekil 9. Apoptosis ve İskemi ilişkisi

2.5.Çalışmada Kullanılan Maddeler

2.5.1. NADH (Nikotin Adenin Dinükleotid Hidrit)

NADH, (Nikotin Adenin Dinükleotid Hidrit) insan vücudunda tüm canlı hücrelerde doğal olarak bulunan bir koenzimdir. NADH aynı zamanda Coenzym 1 olarak da adlandırılır ve Vitamin B3'ün bir türevidir.

Beyin, kalp, sindirim sistemi, kas vücudumuzun hangi parçası olursa olsun enerji ihtiyacını NADH'tan sağlayabilir. NADH, hemen hemen tüm vücuttaki biyokimyasal ve metabolik reaksiyonların katalizi için gerekli olan ATP üretilmesine

olanak sağlar. Krebs çemberinde, hücresel solunumda ve metabolizma gibi temel olaylarda enerji üretir. NADH, ilk olarak Amerikan Tıp araştırmacısı Dr. Nathan KAPLAN tarafından 1934 de keşfedilmiştir. Hücrelerin enerji üretiminde önemli rol oynar.

NADH takviyesi alınarak yapılan klinik çalışmalarda şu yararları gösterilmiştir.

- ATP enerji üretimini artırır.
- Yorgunluğu azaltır ve yorgunluk duygusunu ortadan kaldırır.
- Dopamin ve adrenalin yaptığı gibi nörotransmitlerin artışını sağlar.
- NADH dolaylı olarak hafıza ve zihinsel gelişimi etkileyen bileşiklerin salgılanmasını sağlar.
- NADH doğal bir antioksidan olarak DNA kırıklarında tamir mekanizmasında önemli rol oynar.

Hücrelerin enerji ihtiyaçları arttıkça hücrede mevcut bulunan NADH miktarında artar. Örneğin kalp hücresi 90 µg/g, beyin ve kas hücreleri içeren doku 50 µg/g, karaciğer hücreleri 40 µg/g, kırmızı kan hücreler 3 µg/g NADH içermektedir (Nadlinger ve ark., 2002). Nadlinger ve ark. (2002) de yapmış oldukları çalışmada intraselüler bulunan ATP'nin kan hücrelerindeki NADH miktarı ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir.

2.5.2. Resveratrol

Bitkisel kaynaklı çeşitli yiyecek ve içecekler, bitkiler tarafından hasara ya da fungal ataklara karşı sentezlenen birtakım flavonoid yapıda olmayan fenolik bileşikler içermektedirler. Bunlar arasında resveratrol, stilben fitoaleksinlerin ana aktif bileşiği olarak belirlenmiştir. Resveratrol kimyasal olarak flavonoid yapıda, polifenolik, steroid olmayan bir bileşik olup estrogen benzeri biyolojik aktiviteye sahiptir. Arichi ve ark., *Polygonum cuspidatum* adlı bitkinin kurutulmuş köklerinin geleneksel Japon ve Çin tıbbında “Kojo-kon” adı verilen drog olarak kullanıldığını belirtmiştir. Kojo-kon “Itadori” olarak da adlandırılmış ve mantar hastalıkları, inflamasyon, kalp, karaciğer ve damar hastalıklarının tedavisinde kullanılmıştır ve

bütün bu yararlı etkilerden *Polygonum cuspidatum*'un primer aktif bileşeni olan resveratrolün sorumlu olduğu gösterilmiştir (Arichi ve ark., 1982).

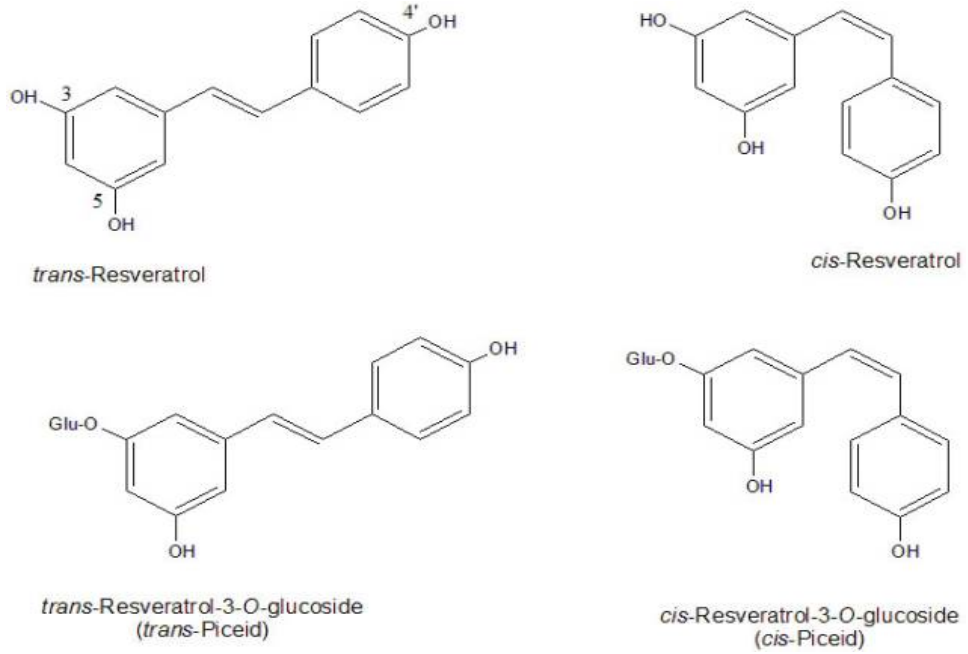
Resveratrol, *Polygonum cuspidatum*'dan başka üzüm, yer fıstığı ve ananasda da bulunmaktadır. Trans-resveratrol ilk olarak 1976 yılında Langcake ve Pryce tarafından asma yapraklarında tespit edilmiştir ve bileşiğin fungal enfeksiyona veya ultraviyole (UV) ışığa maruziyete cevap olarak yaprak dokuları tarafından sentezlendiği gösterilmiştir. Bitkiler ayrıca resveratrolün glukozid formunu da sentezlemektedir.

Üzümlerde resveratrol miktarı asmanın yetiştirildiği toprak, hava gibi koşullara, *Botrytis cinerea* adı verilen küfle enfekte olmasına ve şarapçılıkta kullanılan yöntemlere bağlı olarak değişebilmektedir. Üzümlerde resveratrol sentezi stres, zedelenme, enfeksiyon ve UV ışınları gibi dış faktörlere bağlı olarak değişim göstermektedir (Cantos ve ark., 2003).

Resveratrol üzüm kabuklarında 5-7 ppm, çekirdeklerinde 1 ppm, etli kısımlarında 0.1 ppm'den azdır (Douillet ve ark., 1999). Kırmızı şaraplarda üzümün kabukları ile birlikte cibre fermentasyonu yapıldığı için kabuklardan geçen resveratrol miktarı ortalama 1-11 ppm kadardır (Soleas, 1997).

2.5.2.1 Resveratrolün Kimyasal Yapısı

Resveratrol cis ve trans izomer şekillerde bulunur. Ayrıca cis ve trans şeklinde glukozid olarak glukoz molekülüne bağlanarak da oluşur. Resveratrol yağ, di metil sülfoksit (DMSO) ve alkolde çözünen bileşiktir. Molekül ağırlığı 228 g/mol, erime sıcaklığı 253-255 °C dir. Kapalı formülü $C_{14}H_{12}O_3$ dür. Şaraplarda trans resveratrol, cis resveratrole göre daha fazladır. Şarap ışık ve oksijen aldığı zaman trans izomerlerin cis izomerlere dönüştüğü belirlenmiştir (Chen ve ark., 2002). Trans-resveratrolün üzüm suyu ekstraktlarında stabilitesi gerek 2 yıl süre ile % 60 nem ve oda sıcaklığında ve gerekse %75 nem ve 40 °C de 4 sene süre ile hızlandırılmış stabilite testleri sonucunda elde edilen veriler resveratrolün stabilitesini koruduğu yönündedir (Prokop ve ark., 2006).



Şekil 10. Resveratrolün yapısı (Chen ve ark., 2002)

2.5.2.2 Resveratrol Sentezi

Resveratrol bitkilerde fenil alaninden birkaç basamakta sentezlenir. Fenil alaninden fenilalanin amonya liyaz enzimi ile deaminasyonla cinnamic asit oluşur. Bu bileşik cinnamate 4-hidroksilaz ile 4-coumaric asite dönüşür. 4-coumarat ile Co-A esteri oluşur. Bu ester CoA ligaz' dır. 4-coumaryl Co-A ile 3 malonyl Co -A stilben sentaz enzimi ile resveratrole dönüşür (Wu, 2001).

2.5.2.3 Resveratrolün Ekstraksiyonu ve Analizi

Doğal kaynaklardan resveratrolün ekstraksiyonu düşük miktarlarda olması nedeniyle zaman alıcıdır. Resveratrolün ekstraksiyonunun kısa bir sürede denatüre olmadan yapılması gerekir. Son senelerde HPLC-GC ile birçok metod geliştirilmiştir.

Genellikle HPLC de UV modunda C18 reverz faz kolonu kullanılarak ölçülmektedir. Trans- resveratrol 307 nm, cis- resveratrol ise 280 nm de ölçülmektedir. Bitkilerden resveratrol ekstraksiyonunda genellikle etil veya metil alkol kullanılmaktadır. Yerfıstığı ve ürünlerinde genellikle alkol ekstraksiyonu sonrasında, elde edilen resveratrol ekstraktı Al₂O₃:Silikajel 60 R18 kolonundan geçirilip HPLC’de ölçülmektedir (Sobolev ve ark., 1995). Çikolata ve kakao liköründe ise önce yağ alınıp, elde edilen ekstrakt etanolde çözüldükten sonra kurutulup alkolde çözülüp HPLC’ de ölçülmüştür (Christine, 2006).

2.5.2.4. Resveratrolün Ticari Üretimi

Resveratrol ticari olarak asma bitkisine alüminyum klorür veya alüminyum sülfat ve UV ışık uygulaması ile üretilmektedir (Cantos, 2000). Genellikle ticari olarak resveratrol içeren hapların eldesinde *Polygonum cuspidatum*’un kurutulmuş kökleri kullanılmıştır. Daha çok Çin, Hindistan ve Japonya’da resveratrol hapları çeşitli firmalar tarafından satılmaktadır (Alkan, 2006).

2.5.2.5. Resveratrolün Biyolojik Etkileri

Sadece son birkaç yılda resveratrol üzerinde yayınlanmış 200 kadar makale vardır. Bu makalelerin çoğunda resveratrolün antioksidan, kalp damar hastalıkları, kanserin ilerlemesi üzerinde önleyici etkileri incelenmiştir. Resveratrolün etkilerinin tıbbi yönden araştırılması Fransızların kolestrolü yüksek gıdalar almasına karşılık, kalp-damar hastalıkları yüzdesinin düşük olmasını kırmızı şarap tüketimine bağlanmıştır. Buna “Fransız paradoksu” adı verilmektedir (Alkan, 2006).

Bundan sonraki çalışmalar, kırmızı şarabın bileşiminde bulunan maddelerin incelenmesi yönünde olmuştur. Mikroorganizmalara olan etkilerinin araştırılması konusunda yapılan çalışmalara *Botyrtis cinerae* enfeksiyonlarını durdurması nedeniyle başlanmıştır. İnsanlarda deri enfeksiyonlarında etkili olan bakteri patojenleri üzerinde etkisi incelenmiş *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*

ve *Pseudomonas aeruginosa* nın 171-342 µg/ml resveratrolle inhibe olduğu belirtilmiştir. Trichophyton gibi bazı fungus türlerinin de 25-50 µg/ml resveratrolle inhibe olduğu belirtilmiştir (Marion, 2002). Ayrıca klinik önemi olan *Neisseria gonorhoeae* ve *Neisseria meningitidis* (Docherty, 2001) ile *Helicobacter pylori* (Mahady, 2000) gibi bakterilerin büyüme ve gelişmelerini engellediği de belirtilmektedir ve ayrıca *Herpes simplex* replikasyonunu (Docherty, 1999) da engellemektedir. Çeşitli çalışmalar resveratrolün pıhtılaşmayı engellediğini ortaya çıkarmıştır. Kalsiyum konsantrasyonunun hücre içinde artması pıhtı birikiminde önemli rol oynar. Resveratrol Ca girişini engelleyerek pıhtı birikimini de engeller. Lipid peroksidasyonunu önler. Hücre membranlarını koruyarak canlı hücrelerde oksidatif streslerin etkilerini azaltır (Dobrydneva ve ark., 1999).

2.5.3. Trimetazidin (TMZ)

Kimyasal olarak 1-[(2,3,4-trimethoxyphenyl)methyl] piperazine tanımlanır. Trimetazidin angina pectoris, periferik damar yetmezliğinde kullanılmaktadır.

Genel olarak TMZ'in koruyucu etkileri şu faktörlere bağlanabilir.

-Serbest oksijen radikalleri üretiminin inhibisyonu ve bunun sonucunda membran lipidlerinin peroksidasyonlarının azalması (Maridoneav ve Harpey, 1985).

-İnorganik fosfat ve fosfo kreatinin salınımının azalması ve böylece ATP tasarrufu sağlanması (Lavanchy ve ark., 1987).

-Lipid peroksidasyonun engellenmesi ve tercihli olarak eksojen glukozun kullanılması (Mody ve ark., 1987).

-Hücre içi asidozun sınırlandırılması (Lagadic ve ark., 1996).

-Mitokondrinin fonksiyonunun korunması; ayrıca, TMZ'nin hipoksi oluşturulmuş izole kalp hücrelerinde fizyolojik aktiviteyi koruduğu (Fantini ve ark., 1997), muhtemelen iyon akışını değiştirerek hücre içi pH'ını düzenlediği ileri sürülmüştür (Davies, 1987).

TMZ'nin, hücrelerin içinde aşırı Na^{+2} ve Ca^{+2} birikimini inhibe edip ve K^{+} kaçısını engelleme suretiyle intrasellüler ödemi önlediği bildirilmiştir. İskemi sırasında aşırı miktarda serbest oksijen radikallerinin üretilmesi antioksidan enzimlerin nötralizasyon kapasitesini aşar. Bu durum membran lipidlerinin

peroksidasyonuna ve karbonhidrat ve proteinlerin katabolizmasına yol açar (Kay, 1999). Ayrıca aşırı süperoksit üretimi sonucunda azalan ATP rezervleri mitokondrial enerji metabolizmasının bozulmasıyla ilişkilidir (Guarleniri ve Muscari, 1990). Böylece serbest oksijen radikallerinin zararlı etkileri muhtemelen Na/K ATPaz'ların inhibisyonuyla sonuçlanır. Serbest oksijen radikalleri ayrıca membran lipidlerinin peroksidasyonundan sonra hücre membranındaki pasif K⁺ difüzyonunun artmasına bağlı olarak intrasellüler K⁺ azalmasına yol açarlar. İskemi sırasında TMZ, intrasellüler ATP düzeylerinin azalmasına ve hücre dışına K⁺ kaçışına neden olan serbest oksijen radikallerinin aşırı miktarda serbest kalmasını önleyebilir. Bu nedenle TMZ, hipoksik/iskemik bozukluklar sonucunda sinir sistemi düzeyinde aktif bir ilaç olabilir.

Trimetazidinin oral ve parenteral formları bulunmaktadır. Günlük 60 mg' dan iki veya üç eşit doza bölünerek uygulanabilmektedir. Trimetazidinin ağız yoluyla uygulandıktan sonra barsak mukozasından hızla emilir. 10 mg'lık tek bir oral dozdan sonra TMZ'nin ortalama plazma konsantrasyonuna (C: 53,6 mikrogram/L) 1,8 saatte erişmektedir.

Tek ya da tekrarlanan dozlardan sonra TMZ'nin vücuttan atılma yarılanma ömrü yaklaşık 6 saattir. Uygulanan TMZ'nin dozunun % 80'den çoğu 48 saat içinde ve %62 'si değişmeksizin idrarla atılır. İdrarda 8 metabolit saptanmış olmakla birlikte, özellikleriyle ilgili çok az şey bilinmektedir.

Sucu ve ark. (2002) de yapmış olduğu çalışmada sıçanlara günlük 2 doz halinde 10 mg/kg Trimetazidin maddesinin sıçanlara verilmesi ve sonrasında oluşturulan iskemi reperfüzyona karşı yapılan GSH, SOD analizlerinde iskemi grubuna göre anlamlı bir şekilde koruduğu gözlemlenmiştir.

Sulikowski ve ark. (2008) de yapmış olduğu çalışmada sıçan böbreğinde oluşturulan iskemi sonrasındaki toplam pürin nükleotidleri arasındaki değişime bakıldığında, iskemi yapılmış grup ile TMZ verilmiş iskemi grubu arasında kayde değer fark gözlemlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Bu çalışma Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Yeni Zelanda ırkına ait tavşanlar kullanılmıştır. Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 1900-2100 g olan tavşanlar kullanıldı. Denekler 4 gruba ayrılarak her gruba standart hazırlık, anestezi ve cerrahi teknik uygulanmıştır. Her grupta bulunan tavşanlar aynı laboratuvar ortamında tutuldu. Tavşanlar oda sıcaklığında 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta kalacak şekilde kafeslere konuldu. Tüm gruplara aynı standart tavşan yemi verilerek yiyecek alımları sağlandı ve hayvanların günlük takipleri yapıldı.

1. Grup (Kontrol gurubu) : Bu grup 6 denekten oluşmuştur. Bu gruba herhangi bir madde verilmemiş olup, sadece normal değerlerin saptanması amaçlanmıştır. Deneyde tavşanların bir gözüne iskemi yapılarak diğer gözüne herhangi bir işlem uygulanmadan kontrol amaçlı kullanılmıştır.

2. Grup (NADH + İ-R) : Bu grup 5 denekten oluşmuştur. Bu gruba ticari olarak temin edilen NADH, iskemi öncesi günlük 10 mg/kg olacak şekilde tek doz halinde toplam 30 gün oral yol ile madde verimi yapılmıştır. Bu gruba madde verimi bitimini takiben, bir gözlerine 45-50 dakikalık iskemiden sonra 24 saat süre ile reperfüzyon, ardından da hayvanlar kesilmiştir.

3. Grup (Trimetazidin + İ-R) : Bu grup 5 denekten oluşmuştur. Bu gruba ticari olarak temin edilen Trimetazidin iskemi öncesi günlük 10 mg/kg olacak şekilde 2 doz halinde toplam 30 gün oral olarak madde verimi yapılmıştır. Bu gruba 45-50 dakikalık iskemiden sonra 24 saat süre ile reperfüzyon gerçekleştirildi.

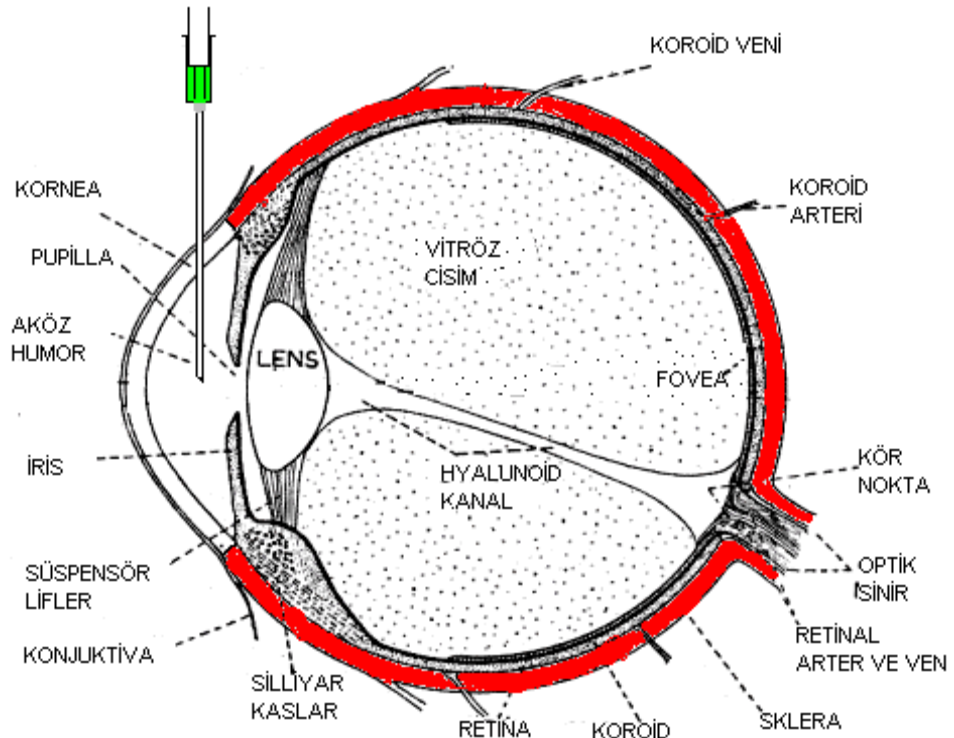
4. Grup (Resveratrol + İ-R) : Bu grup 5 denekten oluşmuştur. Bu gruba ticari olarak temin edilen Resveratrol 48 saat aralıklarla tek doz olacak şekilde 25 mg/kg olacak şekilde oral yol ile 30 gün madde verimi yapılmıştır.

3.2. Anestezi Tekniği

İntramuskular olarak, 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar,) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompon, Bayer, Türkiye) kombinasyonu ile anestezi ve analjezi sağlandı.

3.3. İskemi-Reperfüzyon Oluşturulması

Denekler yüzüstü pozisyonda yatırılarak anestezi ve analjezi uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir madde verimi yapılmadı. Kontrol grubu, Trimetazidin, NADH ve Resveratrol grubundaki deneklerin bir gözüne retinal iskemi oluşturmak amacıyla, serum fizyolojik şişesine, ucunda insülin iğnesi (27 Gauge) bulunan serum seti takıldı ve bu insülin iğnesi ile temporal limbustan ön kameraya girildi. Göz içi basıncı 150 mm Hg olacak şekilde serum şişesi 204 cm yüksekliğe çıkartılarak tespit edildi ve bu yükseklikte 45-60 dakika süreyle tutuldu. İskeminin başlamasıyla birlikte plasebo grubuna 1 ml serum fizyolojik subkutan olarak verildi.



Şekil 1. İskemi modeli



Şekil 2. İskemi oluşturulmuş tavşanlar

3.4. DNA fragmentasyonu (Apoptozis) analizi

Bu çalışma için Roche firmasına ait Apoptotic DNA ladder kit kullanıldı. İzole edilen genomik DNA fragmentleri yatay jel elektroforez jelinde incelendi.

3.4.1 Örneklerin hazırlanması

- 15-20 mg retina dokusu tartılıp ependorf tüplere alındı.
- Homojenizasyon için Lysis Buffer hazırlandı. Lysis buffer 10 ml Tris EDTA solüsyonu (TE) içerisinde 4 M ürea ve 20 mM NaCl hazırlandı.
- Doku örnekleri 1/10 oranında Lysis buffer'de IKA T10 ULTRA-TURRAX bıçaklı homejenizatörde homojenize edildi.
- Homejenat üzerine 20 mg/ ml olacak şekilde hazırlanmış Proteinaz K solüsyonundan 40 µl ilave edildi.

- Karışım vortekslendikten sonra 55 °C'ye ayarlanmış Termal karıştırıcıda 2 saat kadar inkübe edildi.
- Homojenatın tamamı genomik DNA analizi için kullanıldı.
- Pozitif kontrol amacı ile bir tüpe kitten 200 µl pozitif kontrol (marker) alındı.
- Ependorf tüplerdeki örneklerin üzerine 200 µl DNA'ya bağlanma solüsyonu eklendi
- Tüpler 72 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örnekler ve pozitif kontrole 100 µl isopropanol ilave edildi.
- Örnekler vortekslendikten sonra pipet yardımı ile filtreli tüplere aktarıldı.
- Örnekler 8000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda oluşan sıvı faz döküldü.
- Tüplere 500 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Toplama tüplerindeki sıvı döküldü ve yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra tüpler santrifüjden çıkarılmadan 10 saniye kadar 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- Filtreler yeni epondorf tüplere aktarıldı.
- Her tüpe Termal karıştırıcıda 70 °C de ısıtılmış elüsyon solüsyonundan 100 µl ilave edildi.
- Tüpler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler atıldı. Toplama tüpünde biriken örnekler analiz için kullanıldı.

% 1.2 Agaroz Jelin Hazırlanması

- 1,8 g agarose tartıldı.
- 150 ml Tris-Borate-EDTA (TBE) eklendi.
- Mikrodalga fırında 360 °C'de çözdürüldükten sonra buna 10 µl ethidium bromide eklendi. Jel solüsyonunun sıcaklığı 50-60 °C'ye geldiğinde jel tankına döküldü.

Tris/Borate/EDTA (TBE) Solüsyonunun Hazırlanması

- 54 g Tris,
- 27.5 g Borik asit,
- 2.9 g EDTA 1 litre distile suda çözülerek 5XTBE stok solüsyon hazırlandı. Çalışmada 1XTBE kullanılacağı için stok solüsyondan 1/5 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Analiz

- Eppendorf tüplere her örnekten 20 µl alındı.
- Her tüpe 5 µl boya (5X) eklendi.
- Her yuvaya 10 µl örnek yüklenerek yatay elektroforezde 1XTBE’de 150 V’de yaklaşık 40 dakika jelde yüzdürülen DNA bantları KODAK Image Station 4000MM Pro cihazında görüntülendi.

3.5. Nitrik Oksit Analizi

Roche firmasına ait Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit kullanıldı. Okumalar; BMG Labtect FLUO Star Omega florimetre cihazında yapıldı.

3.5.1.Doku Homojenizasyonu

- 20-25 mg retina dokusu tartılarak eppendorf tüplere alındı. Bu aşamadan itibaren doku örnekleri soğuk zincirde kalmasına dikkat edildi.
- Dokular 10 mM N-ethylmaleimide (NEM) ve 2.5 mM EDTA içeren Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline, PBS) içerisinde 1/10 oranında seyreltildi.
- Doku örnekleri buz ortamında IKA T10 Basic ULTRA-TURRAX bıçaklı homojenizatörde homojenize edilerek 14000 g’de + 4 °C’de 13 dk santrifüj edildi.

- Süpernatantlar kullanılmak üzere yeni ependorf tüplere aktarıldı.

3.5.2.Kit İçeriğindeki Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması:

Koenzim Tabletlerinin Hazırlanması

- 3 adet koenzim tableti
- 1 ml potasyum fosfat tamponu

Nitrat Redüktaz Solüsyonu

- Nitrat redüktaz solüsyonu
- 600 µl ultra saf su

Standart Solüsyonun Hazırlanması

Potasyum nitrat standart konsantrasyonu 80 mM dan 80 µM' a dilüe edildi ve Çizelge 1 de gösterildiği gibi konsantrasyon serisi hazırlandı.

Çizelge 1. Standart solüsyon konsantrasyonları

Standart no	Saf su ile dilüsyon	Stok	Konsantrasyon
1	497.5 µl	2.5 µl	0.4 µM
2	495 µl	5 µl	0.8 µM
3	490 µl	10 µl	1.6 µM
4	475 µl	25 µl	4 µM

Örneklerin Hazırlanması

- 150 µl örnek alındı.
- 350 µl reaksiyon solüsyonu olarak potasyum fosfat tamponu eklendi.
- Tüm örneklere eşit miktarlarda Koenzim karışımı ilave edildi.
- Karışımlar 25 °C de 30 dakika inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra örnekler mikropalakaya şu işlemler yapılarak yerleştirildi.

İnkübasyondan sonra örnekler mikropalakadaki yuvalara konuldu ve üzerlerine aşağıdaki tabloda belirtilen miktarlarda Ayıraç I ve II ilave edildi.

Çizelge 2. Karışımın mikropalakalara yüklenmesi.

	Blank	Örnek	Standart
İnkübasyon solüsyonu	150 µl	150 µl	150 µl
Ayraç 1	75 µl	75 µl	75 µl
Ayraç 2	75 µl	75 µl	75 µl

Karışım 5 dakika 25 °C de inkübe edildi.

Örneklerin absorbans değerleri BMG FluoStar Omega cihazında 550 nm'de okundu. Örneklerden elde edilen absorbans değerleri kalibrasyon eğrisinden oluşan formül yardımı ile hesaplandı.

3.6.HPLC ile Pürin miktarlarının ölçülmesi

Tavşanlarda oluşturulmuş retinal iskemi reperfüzyon sonucunda oluşan hasarlar pürin nükleotidleri üzerinde değişiklikleri HPLC ile tayin edildi.

Bu çalışma Smolenski ve ark.(1990)' nın belirlemiş olduğu metoda göre yapıldı.

3.6.1.HPLC için örneklerin hazırlanması

- 25-30 mg retina dokusu tartıldı.
- Dokular 200 µl % 8 lik Perklorik asit içerisinde bıçaklı homojenatör ile homojenize edildi.
- Karışım 5000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatantlar yeni tüplere alındı
- Nötralizasyon işlemi için 1 M KOH (potasyum hidroksit) dan 20 µl ilave edildi
- Karşım tekrar 5000 g' de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatantlar HPLC analizi için kullanıldı.

3.6.2.Standartların Hazırlanması

- Tüm Pürin nükleotidlerinden oluşan bir standart karışım hazırlandı. Ölçülebilen değerler buna göre hesaplandı.
- 5 farklı konsantrasyonda standartlar hazırlandı.

3.6.3. HPLC Analiz Şartları

- Bu analiz için gradient sistem kullanıldı. 2 ayrı mobil faz hazırlandı.
- **A:** 0.1 Molar KH_2PO_4 içerisinde 4 mM Tetra butilamonyum bihidrojen sülfat hazırlanarak pH 6'ya ayarlandı.
- **B :** A Mobil fazından ve Metanoldan 70: 30 oranında karışım hazırlanarak pH 7.2 ye ayarlandı.
- Analiz için Waters 2795 HPLC cihazı kullanıldı.
- Analiz PDA (Photodiode Array Dedectör) ile 254 'nm de yapıldı.
- Supelcosil LC-18 T 150 x 4.6 mm 3 µm çapında kolon kullanıldı.
- Numuneler ve standartlar otosampler 5 °C' ye soğutuldu, 25 °C kolon sıcaklığında, injeksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlandı.

- Tüm örnekler ve standartlar enjeksiyon öncesi 0.45
- Analiz öncesi gerekli şartlarda kolon şartlanması sağlandı.

HPLC Gradient şartları şöyledir:

Çizelge 3. HPLC akış gradienti

Zaman (dk)	Akış (ml)	Mobil faz B(%)
0	1.1	0
2.5	1.1	0
5	1.1	30
10	1.1	60
13	1.1	100
17	1.1	100
20	1.1	0

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

Çalışmada sırasıyla kontrol grubu 2200 ± 150 g (n=6), NADH grubu 1900 ± 100 g (n=5), trimetazidin grubu 2100 ± 150 g (n=5) ve resveratrol grubu 2200 ± 150 g (n=5) olmak üzere tavşanlar kullanıldı. Bunlar sırasıyla; 1.Grup; kontrol (etken madde uygulanmayan grup), 2. Grup; NADH grubu + iskemi-reperfüzyon (tavşanlara 30 gün boyunca 24 saat aralıklarla 10 mg/ml/kg olmak üzere oral olarak madde verimi yapıldı), 3. Grup; Trimetazidin + iskemi-reperfüzyon (30 gün boyunca 12 saatte bir 10 mg/ml/kg Trimetazidin uygulanan grup) ve 4. Grup; Resveratrol + iskemi-reperfüzyon (30 gün boyunca 48 saatte bir 25 mg/ml/kg Resveratrol uygulanan grup) olmak üzere düzenlendi.

Grupların retina dokusunda bulunan nitrik oksit (NO[·]), BMG Labtect FLUOStar Omega cihazı yardımı ile ölçülüp kaydedildi.

Grupların retina dokusunda apoptotik DNA Ladder kit ile apoptozise bakılıp agaroz jelde yüzdürülerek Kodak Image Station 4000MM Pro cihazı yardımı ile görüntü elde edilmiştir.

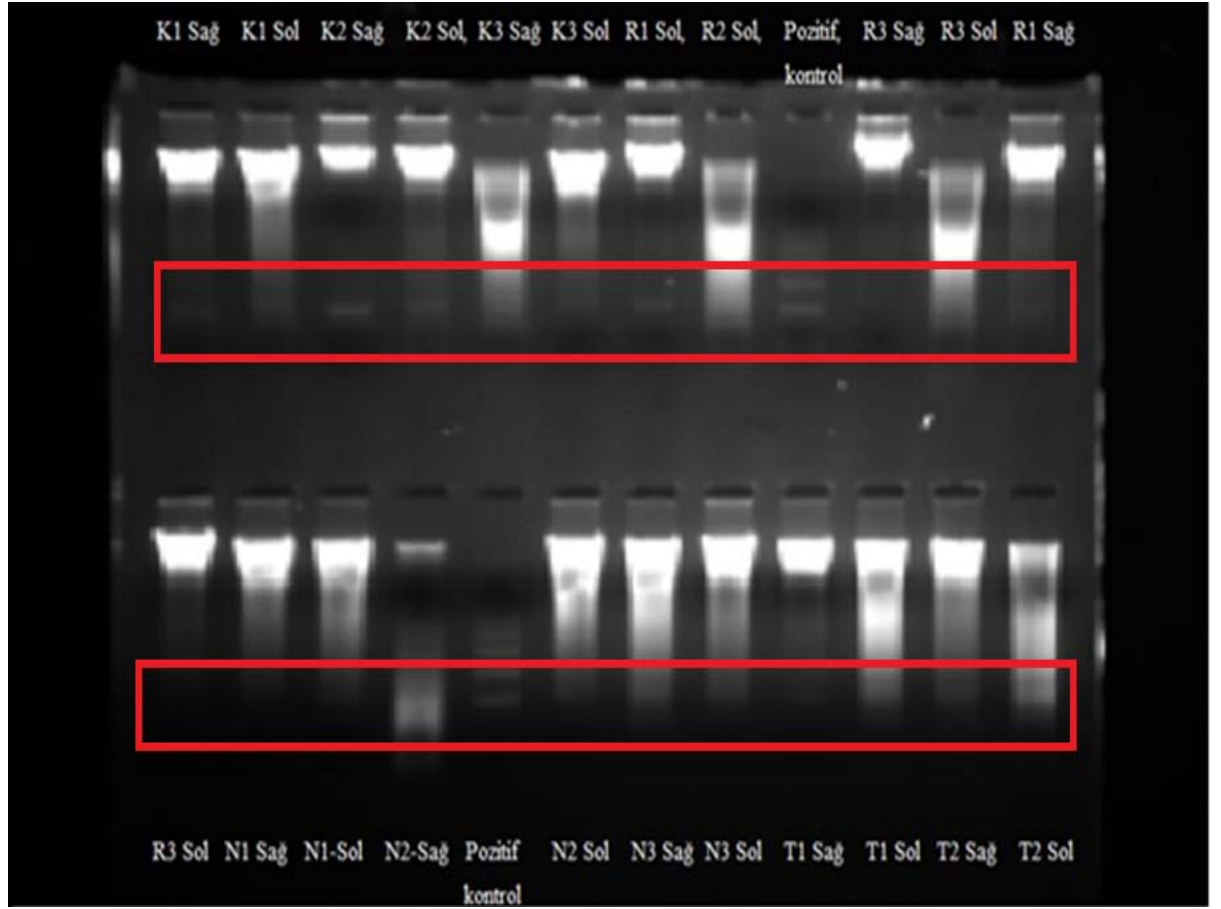
Grupların pürin nükleotitleri miktarlarındaki değişmeler 2795 Waters HPLC sistemi ile ölçülüp kaydedildi.

4.1.1. Klinik Sonuçlar

Hiçbir grupta yem ve su tüketiminde anormal durumlar gözlenmedi.

4.1.2. DNA fragmentasyonu (Apoptozis) sonuçları

Apoptozisin en önemli özgül yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Küçük molekül yapısına sahip DNA bantları ağır olanlardan daha hızlı bir şekilde hareket ettiğinden daha hızlı bir şekilde ilerler. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsünün ortaya çıkmasına neden olur.



Şekil 1. DNA fragmentasyon jel görüntüsü

K1SAĞ: İskemi uygulanan kontrol

K1SOL: İskemi uygulanan kontrol

K2SAĞ: İskemi uygulanmayan kontrol

K2SOL: İskemi uygulanan kontrol

K3SAĞ: İskemi uygulanmayan kontrol

K3SOL: İskemi uygulanan kontrol

R1SAĞ:İskemi uygulanmayan Resveratrol madde

R1SOL:İskemi uygulanan Resveratrol madde

R2SAĞ:İskemi uygulanan Resveratrol madde

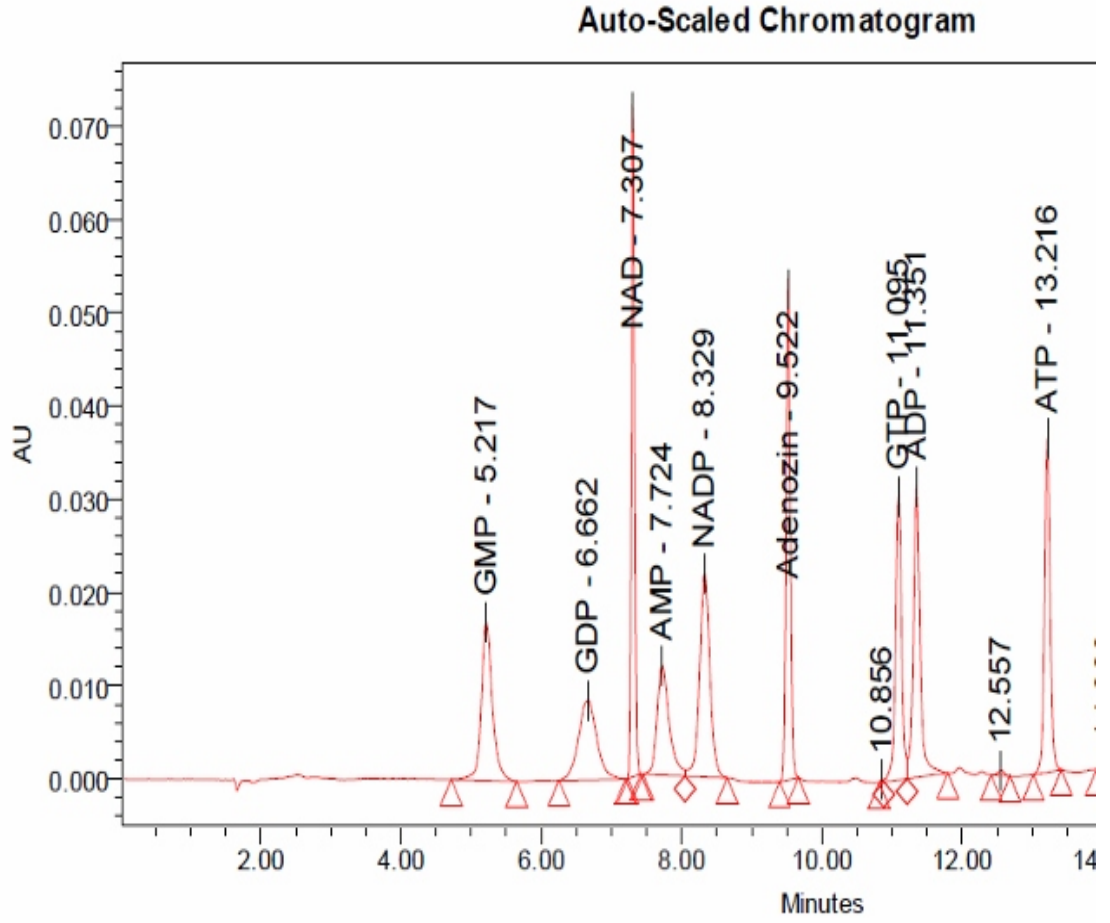
R2SOL:İ skemi uygulanmayan Resveratrol madde

R3SAĞ: İskemi uygulanan Resveratrol madde	R3SOL: İskemi uygulanmayan Resveratrol madde
N1SAĞ:İskemi uygulanan NADH madde	N1SOL: İskemi uygulanan NADH madde
N2SAĞ:İskemi uygulanan NADH madde	N2SOL:İskemi uygulanmayan NADH madde
N3SAĞ:İskemi uygulanan NADH madde	N3SOL:İskemi uygulanan NADH madde
T1SAĞ:İskemi uygulanan Trimetazidin madde	T1SOL:İskemi uygulanan Trimetazidin madde
T2SAĞ:İskemi uygulanan Trimetazidin madde	T2SOL: İskemi uygulanan Trimetazidin madde

Retina örneklerinden izole edilen DNA'ların elektroforez jelinde yüzdürülmesi sonucunda elde edilen görüntülerde apoptotik olgunun özellikle iskemi uygulanan kontrol veya maddelerin verildiği örneklerde DNA kırılmalarının oluştuğu gözlemlenmiştir. İskemik olgularda oluşan apoptotik olgunun verilen maddelerle bu sürecin kısmen engellediği gözlemlenmiştir. Bu maddelerden özellikle NADH ve Trimetazinin kontrol iskemi grubu ve madde verilen iskemi uygulanan gözle karşılaştırıldığında olumlu yönde koruyucu etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

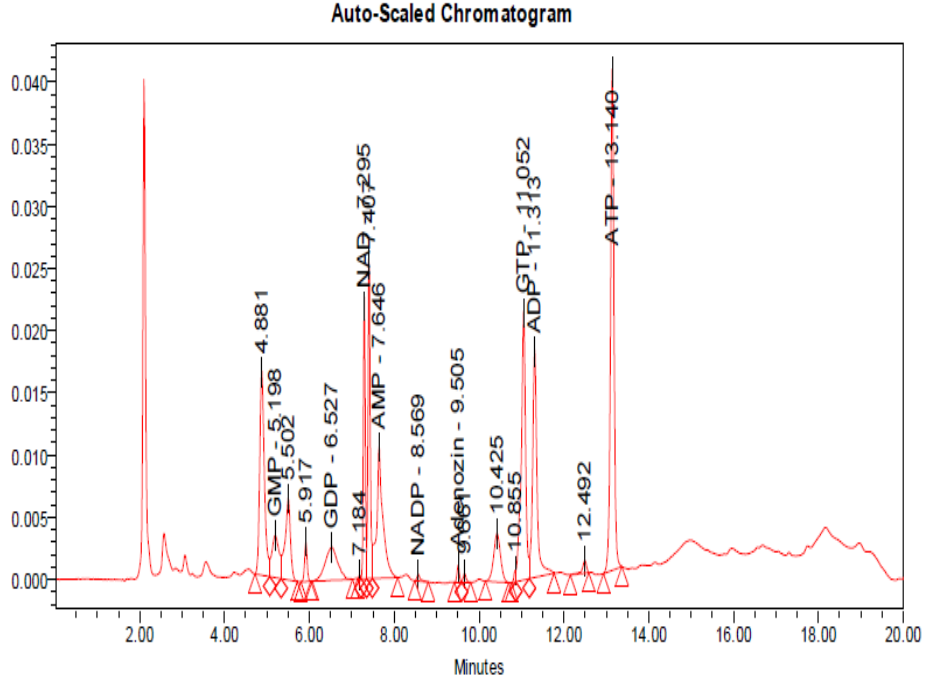
4.1.3 HPLC sonuçları

Tüm örnekler ve standartlar, Waters 2795 HPLC, PDA dedektörde 254 nm de Supelcosil LC-18 T 150 x 4.6 mm 3 µm özelliğine sahip kolonda belirli gradient şartlarında okuması yapıldı.

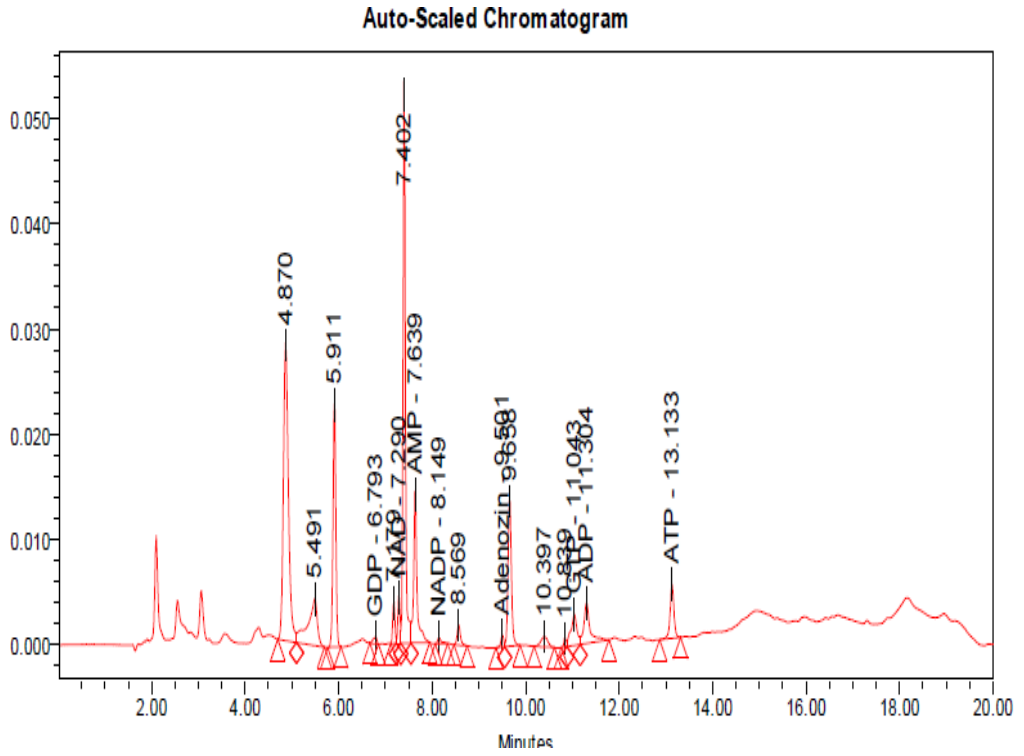


Şekil 2. HPLC pürin standartları karışım kromatogramı

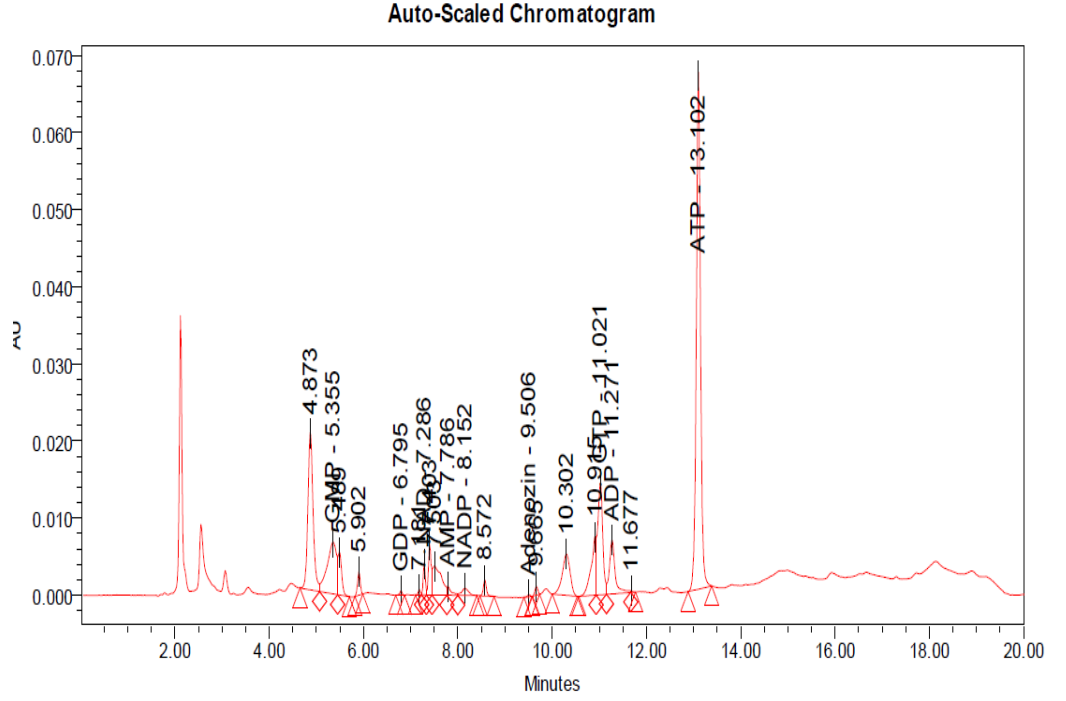
Standartların tanımlama işleminden sonra tüm numuneler için bir proses methodu oluşturularak pürin nükleotidleri hesaplandı.



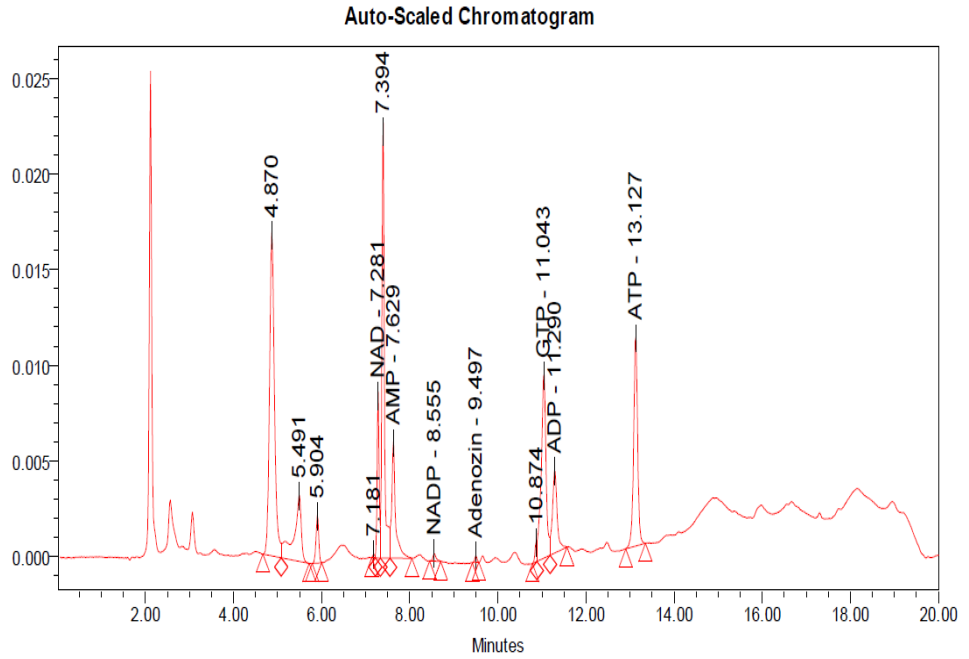
Şekil 15: Kontrol grubu iskemi reperfüzyon yapılmamış sağlıklı göz



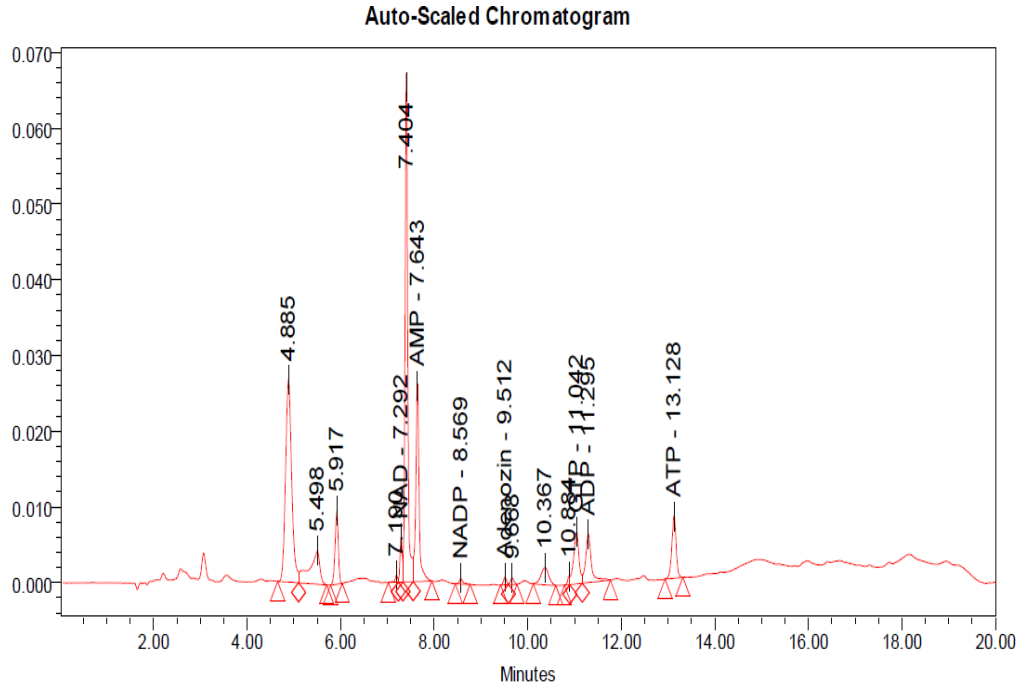
Şekil 16. Kontrol grubu iskemi reperfüzyon uygulanan göz



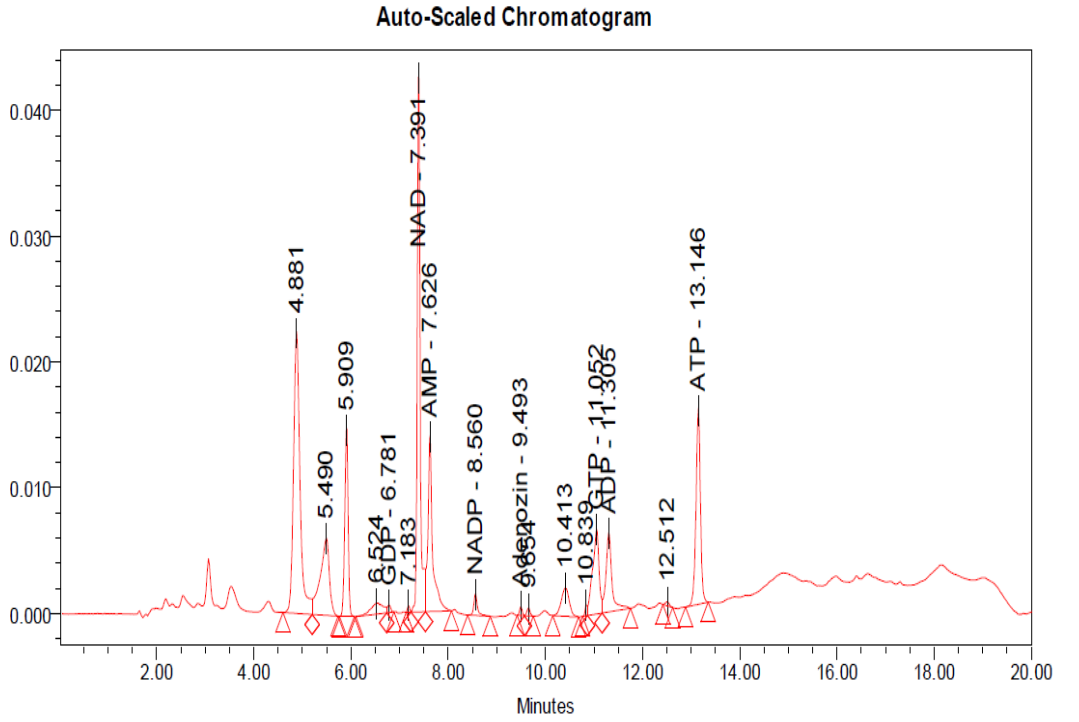
Şekil 17. NADH grubu iskemi reperfüzyon uygulanmayan göz



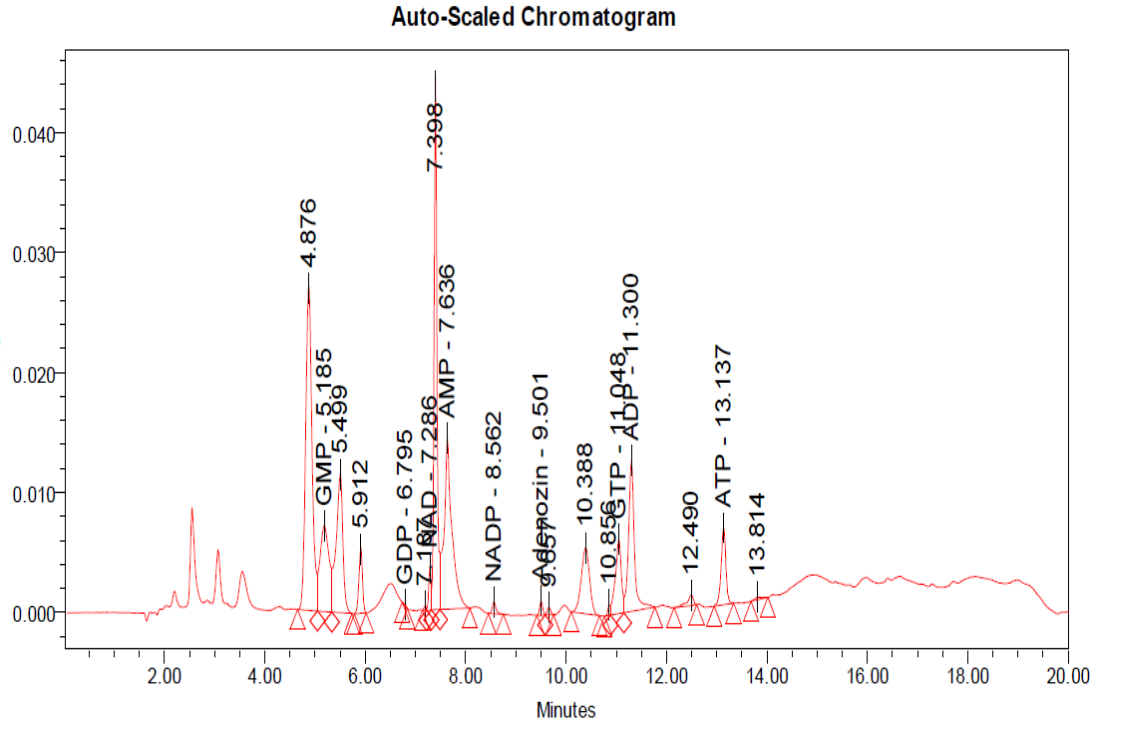
Şekil 18. NADH grubu iskemi reperfüzyon uygulanan göz



Şekil 19. Resveratrol grubuna ait iskemi reperfüzyon uygulanan göz



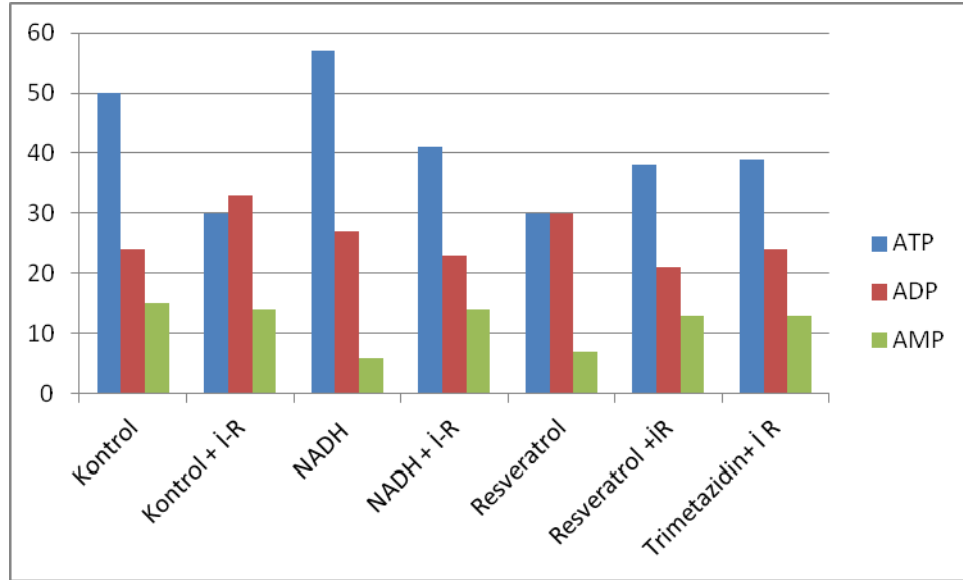
Şekil 20. Resveratrol grubuna ait iskemi reperfüzyon uygulanmayan göz



Şekil 21. Trimetazidin grubuna ait iskemi reperfüzyon uygulanan göz

Çizelge 1. HPLC analiz sonuçları

Örnekler	ATP(μ M/mg)	ADP(μ M/mg)	AMP(μ M/mg)
K1SAĞ	31.3	41	17
K1SOL	34.2	37	14
K2SAĞ	51	24	9.8
K2SOL	29	46.2	11
K3SAĞ	48.9	18	7.2
K3SOL	27	44	11
N1SAĞ	41	21	12
N1SOL	40.1	24	14
N2SAĞ	38.2	26.7	16
N2SOL	57	14.2	6.4
N3SAĞ	42	24.4	11
N3SOL	44.1	28.9	13.3
T1SAĞ	42	30	10
T1SOL	43	31	12
T2SAĞ	41	28.1	14
T2SOL	38	32	12.7
T3SAĞ	35.5	34	16.5
T3SOL	37.2	32	13.9
R1 SAĞ	56	30	7.1
R1SOL	40.1	17	12.6
R2SAĞ	37	29	15.8
R2SOL	57	14	6.4
R3SAĞ	39	32	12
R3SOL	54	30.4	8.4



Şekil 22. HPLC analiz sonuçları

HPLC ile yapılan analizde, pürin nükleotidleri ve enerji miktarlarındaki değişime iskemi uygulanan kontrol grupları ile madde verilip iskemi uygulanan deney grupları karşılaştırıldığında; verilen maddelerin genel itibariyle iskemi süreçte gözlemlenen enerji seviyesindeki değişimlerin kısmen önlendiği gözlemlenmiştir.

4.1.4.Nitrik Oksit Analizi Sonuçları

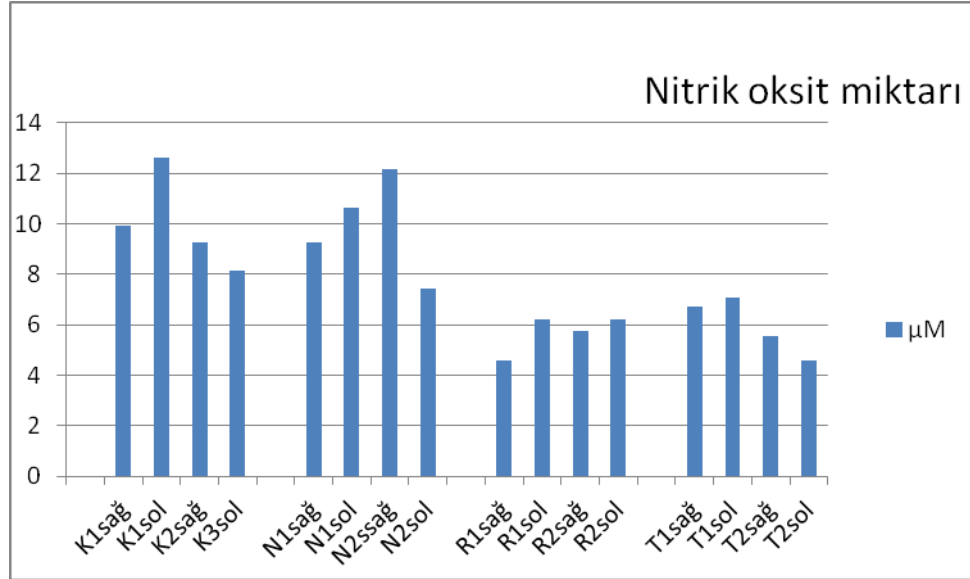
Nitrik oksit (NO); nitrik oksit sentaz (NOS) adlı enzim ile arjininden endojen olarak elde edilir. Düşük konsantrasyonda, Merkezi sinir sisteminde biyolojik haberci molekül gibi davranır ve fizyolojik şartlarda sinaptik plastisite, hafıza oluşumu, vazodilatasyon ile serebral kan akımı ve nöroendokrin sekresyon gibi birçok fonksiyonda rol oynar. Nöronal olarak üretilen NO'un hafıza oluşumunda rol oynadığına dair bazı kanıtlar vardır. Ancak yüksek konsantrasyonda NO, O₂ ile veya süperoksit anyonu (O₂⁻) ile reaksiyona girerek reaktif nitrojen-oksijen radikallerini (RNOS) oluşturur (Lieberman, 2008).

Örnek	Absorbans	μM
K1sağ	0,208	9,94
K1sol	0,264	12,61
K2sağ	0,194	9,27
K3sol	0,17	8,13
N1sağ	0,194	9,27
N1sol	0,223	10,66
N2ssağ	0,255	12,18
N2sol	0,155	7,42
R1sağ	0,095	4,56
R1sol	0,13	6,23
R2sağ	0,12	5,75
R2sol	0,13	6,23
T1sağ	0,14	6,7
T1sol	0,148	7,08
T2sağ	0,116	5,56
T2sol	0,095	4,56

Çizelge 5: Retina dokularındaki nitrik oksit miktarı



Çizelge 6 : Nitrik oksit standartlarının kalibrasyon eğrisi



Çizelge 7: Gruplara ait retina örneklerinde Nitrik oksit miktarları

4.2.Tartışma

İskemi ve reperfüzyon sonucu dokuda meydana gelen hasar, bu hasarda serbest oksijen radikallerinin rolü ve antioksidanların bu hasarı gidermede etkileri konusunda son yıllarda birçok araştırmalar yapılmıştır. İnsan retinası; diabetik retinopati, orak hücre anemisi, glokom, prematüre retinopati ve retinal arter ve ven tıkanıklığı gibi durumlarda iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalmaktadır (Yoon ve Marfor, 1989). İskemi süresi arttıkça doku hasarının büyüklüğü de artar. Dokulara göre farklılık göstermekle beraber iskeminin belirli bir süresine kadar doku, geri dönüşebilen doku hasarı fazına, iskemi süresi arttıkça doku geri dönüşümsüz doku hasarı fazına girer. Bu aşamadaki doku reperfüzyon edilse dahi doku hasarı geri dönmez (Cotran ve ark., 1989). Retina için bu süre 30-90 dk olarak kabul edilir (Aydemir, 2002; Yoneda ve ark., 2001). Dokuya tekrar oksijen desteğinin sağlanmasıyla sisteme aniden aşırı miktarda giren oksijen, serbest oksijen

radikallerinin oluşumuna neden olur. Böylece doku hasarı daha da artar (Bozkurt,1997; Matsubara ve ark., 2000). Reperfüzyonla birlikte dokuya gelen lökositlerin serbest radikal oluşumuna neden olarak oksidatif hasarı arttırdığı bilinmektedir. Lökosit toplanmasının inhibe edildiği bir çalışmada hasarın azaltıldığı gösterilmiştir (Matsubara ve ark., 2000).

İskemi-reperfüzyon hasarından sorumlu olan mekanizmalar; aspartat ve glutamat gibi uyarıcı amino asitlerin açığa çıkması, enerjiye bağlı taşıma sistemlerindeki bozulmalar, özellikle hücre içi kalsiyum miktarının artması, bunun sonucu olarak kalsiyum tarafından yürütülen bazı süreçlerin başlaması ve serbest radikallerin oluşmasıdır (Cotran, ve ark., 1989; Aydemir, 2002). İskemi-reperfüzyon sonrasında oluşan hasarların zarar verici etkilerini ortadan kaldırmak için yapılan bir çalışmada koruyucu madde olarak kullanılan Fluripitin maddesinin ATP düzeyleri arasındaki farklılıklarla karşılaştırıldığında çalışmamızda kullanılan ve yapay bir özellik taşımayan doğal antioksidan etken maddesi olan resveratrolün ATP miktarını korumada daha etkin olduğu gözlemlenmiştir. Yine aynı zamanda doğal bir enerji kaynağı olan NADH'ın iskemi-reperfüzyon esnasında gözlemlenen ATP miktarındaki azalmayı engellediği görülmüştür. İlaç sektöründe yaygın olarak kullanılan Trimetazidin maddesinin de pürin nükleotidleri üzerinde koruyucu etki gösterdiği görülmüştür.

Ayrıca sağlıklı retina dokusunda kontrollü olarak belirli oranlarda oluşabilen apoptozisin iskemi-reperfüzyon sonucu durdurulmuş olduğu tespit edilmiştir. Maddelerin özellikle NADH ve Trimetazidinin verildiği veya bu maddelerin verilip iskemi uygulanan örneklerde kontrole yakın bir aktivite görülmüştür. Bu sonuçlar dikkate alındığında özellikle NADH ve Trimetazidinin ve kısmi olarak Resveratrol maddelerinin iskemik hasarı önlemede etkin rol aldığı anlaşılmaktadır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz çalışmada retinada iskemik süreçte ve reperfüzyon aşamasında dokuda çeşitli hasarlar meydana geldiği gözlemlenmiştir. İskemik süreçte oluşan serbest radikallerin etkileri çeşitli antioksidanlarla en aza indirildiği bilinmektedir.

Retinada HPLC de yapılan pürin nükleotidi analizi sonuçları anlamlı bulunmuştur. Analiz sonuçlarında iskemi uygulanan kontrol gruplarında iskemi yapılmayan göze göre, ATP miktarlarında önemli derecede değişim saptanmıştır. Dokuda iskemi hasarının oluşması sonucu ile ATP miktarlarında azalma olduğu, ATP miktarlarındaki azalmanın iskemi sonrası reperfüzyon aşamasında serbest radikallerin oluşturmuş olduğu bilinmektedir. Bu sebeple iskemi süresi öncesi 30 gün süre ile tavşanlara verilen resveratrol, trimetazidin ve NADH maddelerinin ATP düzeylerini koruduğu gözlenmiştir.

Verilen maddelerden doğal bir antioksidan olan resveratrol ve bir koenzim olan NADH'ın iskemi reperfüzyon esnasında azalan ATP miktarını, ticari bir ilaç etken maddesi olan Trimetazidin oranla daha etkili bir koruyucu etkiye sahip olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda çıkan sonuçlar doğrultusunda iskemik süreçte serbest radikallerin oluşturmuş olduğu hasarların zararlarını minimuma indirmek ve oluşan zararların derecesini azaltmak için verilen madde gruplarından en etkili olan Resveratrol ve NADH olduğu için, böyle bir sürece girmiş bireylerin tedavisinde kullanılacak olan kimyasal ilaçlar yerine tedavide destekleyici olarak kullanılmasını yaygınlaştırılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- ABUJA, M. 2001. Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*; 306:1-17.
- AKKUŞ, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri. Mimoza yayınları 134s. Konya.
- ALINAK, A. 2008. Retinal İskemi/Reperfüzyon hasarında IL-11 Sitokin Seviyeleri Etkisi. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları A.D, Uzmanlık Tezi, Elazığ.
- ALKAN, R. 2006. Doğal bitki antibiyotiği: Resveratrol. *Gıda Teknolojisi Derneği*, 32(5): 259-265.
- ARICHI, H., KIMURA, Y., OKUDA, H., BABA, K., KOZAWA, M., ARICHI, S., 1982. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism, *Chem. Pharm. Bull.*, 30,1766-1770.
- ASLAN, R., ŞEKEROĞLU, M., BAYİROĞLU, F., 1995. Serbest Radikal Türlerin Membran Lipid Peroksidasyonuna Etkileri ve Antioksidan Savunma, *Y.Y.Ü Sağlık Bil. Derg.2*; 137 142
- AUGUSTIN, A., SPITZNAS, M., KOCH, F., GRUS, F., LUTZ, J., 1988. Effects of perfluorooctylbromide and vitamin E on ischemia induced retinal oxidative tissue damage. *Exp Eye Res*: 66:19-24.
- AYBEY, B., TUFAN, H., ve ERGENEKON, G., 1996. Serbest Radikaller. *Türkderm*, 30: 116-122.
- AYDEMİR, O. ve ÇELEBİ, S., 2002. Deneysel retinal iskemi ve reperfüzyon oluşturulan kobaylarda vitamin E türevlerinin glutatyon düzeyine etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 16(3-4): 257-261.
- BARBER, D., HARRIS, S., 1994. Oxygen Free Radicals and Antioxidants: A review. *Am. Pharmavy.* 34(9), 26-35.
- BARRY, M., and GRACE, P., 1997. Ischemia-reperfusion injury. *Surgery*, 11: 68-72.
- BASAGA, H. S., 1990. Biochemical Aspects of Free Radicals. *Biochem. Cell Biol.* 68, 989-998.

- BAST, A., HAENEN, M., DOELMAN, C., 1991. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am. J. Med.*, 91, 3625-3635.
- BAYKAL, Y., ve KOCABALKAN, F., 2000. Serbest radikaller ve hücre hasarı yapma mekanizmaları. *Sendrom*, s.31-38.
- BILINSKI, T., LITWINSKA, J., BLASZCZYNSKI, M., ANDRZEJ, B., (1989). Süperoxide Dismutase Deficiency and the Toxicity of The Products of Autooxidation of Polyunsaturated Fatty Acid in Yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1001, 102-106.
- BONNE, C., MULLER, VILLAIN, M., 1998. Free radicals in retinal ischemia. *Gen. Pharmacol.* 30: 275-280
- BOSMAN, FT., VISSER, BC., VAN, OEVEREN, J. ,1996. Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Review. Pathol Res Pract.* 192: 676-83,
- BOZKURT, N., 1997. Tavşan retinasının İskemi Reperfüzyon hasarından süperoksit dismutaz ve katalaz ile korunması. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 54s
- BRAQUET, P., DOLY, M., 1986. Lipid peroxidation effects on isolated rat retina. *Antioxidation in Therapy and Preventive Medicine*, Edited by I. Emerit et al. New York, 847-52
- BRUNORI, M., ROTILIO, G., 1984. Biochemistry of Oxygen Radical Species. *Method. Enzymol.*, 105,22-35.
- BYUNG, PY. 1994. Cellular Defenses Against Damage from Reactive Species. *Physiological Review*,74: 139-172
- CANTOS, E., GARCIA, VC., PASCUAL, TS., TOMAS, B., 2000. Effects of postharvest UV radiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes . *J.Agric.Food.Chem*, 48: 4606-4612.
- CHAN, P.H., 1996. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129.
- CHEESEMAN, K. H. SLATER, T. F., 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49(3),479-480.,
- CHEN, RS., WU, PL., ROBBIN, YY., 2002. Peanut roots as a source of resveratrol *J.Agric.Food.Chem*, 50: 1665-1667.
- CHRISTINE, C., CALLEMINEN, D., COLLIN, S., 2006. Chocolate and

- cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*, 98: 649-657.
- CHUN, MH. KİM, I., JU, W., KİM, K., LEE, M., JOO, C., CHUNG J., 1999. Horizontal cells of rat retina are resistant to degenerative process induced by ischemia-reperfusion. *Neuros. Lett*: 260:125-28
- COTRAN, S., KUMAR, V., and ROBINS, S., 1989. Cellular injury and adaptation In: *Robins Pathologic Basis of Disease*. WB Saunders Company, p38
- CUMMINGS, M., WINTERFORD, C., WALKER, N., 1997. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*, 21:88-101.
- ÇELEBİ, S., DİLSİZ, N., YILMAZ, T., ve KUKNER, A.S., 2002. Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia-reperfusion in the guinea pig retina. *Eur J. Ophthalmol*, 12(2): 77-83.
- DAVİES, K., GOLDBERG, A., 1987. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J.Biol. Chem*, 262, 8227-8234,
- DİLSİZ, N., 2009. *Moleküler Biyoloji*. Palme yayıncılık. 146-151.
- DOBRYDNEVA, Y., WILLIAMS, R., BLACKMORE, PF., 1999. Trans-resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br. J. Pharmacol*, 128:149-157.
- DOCHERTY, J., FU, M., TSAI, M., 2001. Resveratrol selectively inhibits *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J.Antimicrob Chemother* , 47:243
- DOCHERTY, J., FU, MMH., STIFFLER, BS., LIMPEROS, RJ., POKABLA, CM., DELUCIA, AL., 1999. Resveratrol inhibition of Herpes simplex virus replication. *Antiviral Res*, 43:135
- DORMANDY, T., 1983. An approach to free radicals. *Lancet*, 322:1010-1013.
- DOUILLET, B., JEANDET, P., ADRIAN, M., BESSIS, R., 1999. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp in response to ultraviolet C elicitation. *J.Agric.Food.Chem* , 47: 4456-4461.
- ERDOĞAN, B., 2003. Apoptosis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptosis. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174.

- FANTINI, E., ATHIAS, P., DEMAISON, L., GYNBERG, A., 1997. Protective effects of trimetazidine on hypoxic cardiac myocytes from the rat. *Funda Clin Pharmacol*,11,427-439,
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., 1992. Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*.;119;493–501.
- GIROTTI, A., 2000. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* ; 39:1529-1542.
- GRACE. P., 1994 Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* ; 81: 637-647.
- GRASSI, B., MICHAEL, C., 2005 *Physiol Effects of nitric oxide synthase inhibition by L-NAME on oxygen uptake kinetics in isolated canine muscle in situ* 568.3 1021–1033
- GUARLENIRI, C., MUSCARI, C., 1990. Beneficial effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac muscle. *Cardiovasc. Drugs Ther.*,4,814-5
- HALLIWELL, B., GUTTERRIDGE, J., CROSS, C., 1993. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 119(6), 598-613.
- HALLIWELL, B., GUTTERRIDGE, J., 1989. Oxygen radicals and singlet oxygen. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford, Clarendon. 93-109.
- HALLIWELL, B., GUTTERRIDGE, J., 1989 *Free radicals in biology and medicine.* 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres., 125
- HALLIWELL, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence *The Lancet.* 344, 721-24.
- HIKIM , A., WANG, C., LEUNG, A., SWERDLOFF, S., 1995. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 136 : 2770-2775
- İŞLEKEL, H., İŞLEKEL, S., ve GÜNER, G., 2000. Biochemical Mechanism and Tissue Injury of Cerebral Ischemia and Reperfusion. *J Nuero Sci*, 17: 45-49

- KARBOWNIK, M., REITER, R., 2000. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Experimental Biology and Medicine*. 225, 9-22
- NADLINGER, K., WESTERTHALER, W., BIRKMAYER J., 2002 Extracellular metabolisation of NADH by blood cells correlates with intracellular ATP levels *Biochimica et Biophysica Acta* 1573 177–182
- KAY, L., FINELLI, C., AUSSÉDAT, J., 1999. Improvement of long term presservation of the isolated arrested rat heart by trimetazidine : effects on the energy state and mitochondrial function. *Am*;26, 791-810
- KELM, M., DAHMANN, R., WINK, D., 1997. The nitric oxide/superoxide assay. *J Biol Chem.*; 272 : 9922-32
- KERR, J., WINTERFORD, C., HARMON, B., 1994. Apoptosis; its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73 8: 2013-2026
- KIECHLE, F., MALINSKI, T., 1993. Nitric Oxide : Biochemistry , pathophysiology, and detection . *Am J Clin Pathol*. 1993:100:567-75
- KÖSE, K., ve DOĞAN, P., 1992. Lipid Peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi*, 1: 340-350
- KUZU, M., KÖKSOY, C., KALE, İ., 1998. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surgery* ; 176: 348-351
- LAGADIC, G., PRIGENT KLE, FEUVRAY, D., 1996. Effects of trimetazidine on pH regulation in the rat isolated ventricular myocyte. *Br. J. Pharmacol*, 117, 831-838
- LANGCAKE, P., PRYCE, R.J. 1996. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the vitaceae as a response to infection or injury, *Physiol. Plant Pathol.*, 9, 77-86
- LAVANCHY, N., MARTIN, J., ROSSI, A., 1987. Anti-ischemic effects of trimetazidine: PNMRSpectroscopy in the isolated rat heart. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther*; 286, 97-110
- LIEBERMAN, M., MARKS, A., 2008. Marks' Basic Medical Biochemistry: Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins; 3rd edition; 439-57
- LOWRY, S., CALVANO S., 1999. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), *Principles of Surgery*. Mc Graw-Hill 7th Edition; Vol I: 13-32

- LOWESTEIN, C., DINERMAN, J., SNYDER, S., 1994. Nitric Oxide: A physiologic Messenger. *Ann Intern Med.* 120: 227-37.
- MAHADY, G., PENDLAND, S., 2000. Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *Am.J.Gastroenterol*,95:1849.
- MARIDONNEAU, P., HARPEY, C., 1985 Effect of Trimetazidine on membrane damage induced by oxygen free radicals in human red cells. *Br.J.Clin.Pharmacol.*20,148-151.
- MARION M., 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogen of the skin. *Biochemical Pharmacology*, 63:99-104.
- MARKESBERY, W., 1997. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer. s Disease. *Free Radical Biology And Medicine.* 23(1),134-147.
- MATSUBARA, A., TOMIDA, K., MATSUDA, Y., 2000. Protective effect of selectin ligands/inhibitor (SKK 60060) against retinal ischemiareperfuzyon injury. *Academic pres. Exp. Eye Res.* 71: 283-293.
- MAXEY, K., JOHNSON, J., 2002 NO: recent developments. *Cayman Currents*, 11:1-4.
- MCCORD, J., 1985. Oxygen Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury *New Engl. J. Med.* 17, 159-163.
- MCCORD, J.M., 1985. Oxygen Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury *New Engl. J. Med.* 17, 159-163.
- MCCORD, J.M., Day, E.D., 1978. Superoxide- depent production of hydroxyl radical catalyzed by iron . EDTA complex. *FEBS Letters*, 86(1), 139-142.
- MILLER, S., 1984. Embryology and Anatomy. Miller SLH (ed): *Parsons' Diseases of the eye.* Churchill Living-stone, Edinbourg ; 3-19.
- MODY, F., SCHELBERT, H., 1988 Trimetazidine induced enhancement of myocardial glucose utilization in normal and ischemic myocardial tissue. *Am.J.Cardiol*;82,42-49,
- MONCADA, S., HIGGS, A., 2002 The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329: -12.
- NADLINGER, K., WESTERTHALER, W., 2002.Birkmayer Extracellular metabolisation of NADH by blood cells correlates with intracellular ATP levels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1573 177– 182.

- NAYAK, M., KITA, M., MARMOR, M., 1993. Protection of rabbit retina from ischemic injury by superoxide dismutase and catalase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* ; 34:2018-22.
- NELSON, DL., COX, M., 2000. *Lehninger principles of biochemistry* 3rd New York : Worth publishers :848
- NEWELL, F., 1986. *Anatomy and Embryology*. Newell FW (ed): Ophthalmology. The C. V. Mosby Company, St. Louis ; 65-75.
- OSBORNE, N., CASSON, R., WOOD, J., CHIDLOW, G., GRAHAM, M., MELENA, J., 2004 Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* ; 23: 91-147.
- PELLEGRINI, G., CHERICI, G., ALESIANI, M., CARLA, V., and MORONI, F., 1990. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia –induced neuronal damage. *J. Neurosci.* 10: 1035-1041.
- PROKOP, J., ABRMAN, P., SELIGSON, AL., SOVAK, M., 2006. Resveratrol and Its glycon piceid are stable polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, 9 (1) 11-14.
- REITER, R.J., 1998. Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Progress in Neurobiology.* 56, 359-384.
- LIY, S., LASER, M., CROSSON, C., 2003. Retinal preconditioning and the induction of heat-shock protein 27. *Invest Ophthalmol. Vis Sci* ; 44: 1299-1304.
- SEMENZA G. 2000. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res.* 86: 117-118.
- SCOTT, D., 2001. Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc(Min/+) mouse, *Gastroenterology* 121 889–899
- SIMONIAN, N., COYLE, J., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 83-106.
- SOBOLEV, V., COLE, R., DORNER, J., YAGEN, B., 1995. Isolation, purification and liquid chromatographic determination of stilbene phytoalexins in peanuts. *J. Assoc.off.Anal.Chem, Int* ,78:1177-1182

- SMOLENSKI, R., LACHNO, D., LEDINGHAM, S., YACOUB, M., 1990. Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *J. Chromatogr.* 527, 414–420.
- SOLEAS, GJ., DIAMONDIS, EP., GOLDBERG, DM., 1997. Resveratrol a molecule whose time has come And gone. *Clinical Biochemistry*, 30: 91-113.
- SUCU N., UNLU, L. TAMER, B. AYTACOGLU, B., 2002. Effects Of Trimetazidine On Tissue Damage In Kidney After Hindlimb Ischemia-Reperfusion *Pharmacological Research*, Vol. 46, No. 4.
- SULIKOWSKI T., DOMANSKI L., CIECHANOWSKI K., ADLER G, PAWLIKA., SAFRANOW K., 2008 Effect of Trimetazidine on Xanthine Oxidoreductase Expression in Rat Kidney with Ischemia_Reperfusion Injury *Archives of Medical Research* 39 459e462
- TÜMAY, M., 2010. Retinis Pigmentosa’da Serbest Radikallerin Rolü. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim dalı*
- WEIGERT A., BRUNE B., 2008 Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression *Nitric Oxide* 19 95–102
- WINROW, V., WINYARD, P., MORRIS, C., BLAKE, D., 1993. Free radicals in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction. *Dr MED Bull.*, 49, 506-522.
- WORD R., PETERS T., KAPLAN L., PESCE A., 1996 editors. *Clinical chemistry*. 3th Ed. Mosby Year Book, Inc. ; 765-777.
- WU, JM., WANG, ZR., HSIEH, TCH., BRUDER, JL., ZOU, JG., HUANG, YZ., 2001. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. *Inter J Mol Med* , 8:3-17.
- YEH. L., ASHTON, A., 1990. The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reserved by oral sorninil. *Metobolism*, 39(6): 619-22.
- YONEDA, S., TANIHARA, H., KIDO, N., HONDA, Y., GOTO, W., HARA, H., and MIYAWAKI, N., 2001. Interleukin-1 beta mediates ischemic injury

ZIMMERMAN, B., GRANGER, D., 1992 Reperfusion injury. Surgical Clinics of North America ; 72: 65-83.

ÖZGEÇMİŞ

1988'de Elazığ'da doğdu. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ'da tamamladı. 2005 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2009 yılı Biyoloji lisansımı tamamlayarak 2009 güz döneminde Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde yüksek lisansa başladı. 2010 yılı güz döneminde Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümüne geçiş yaptı.

ÖZET

Retinal iskemi, görme kaybına ve körlüğe neden olan bir etkidir. Glukoz/oksijen ve glutamat eksikliği nedeniyle oluşan serbest radikaller, retinal iskemideki hasarın önemli bir nedenidir.

İskemi-reperfüzyon, serbest radikal oluşumu, hücrdeki pürin miktarlarındaki değişmeye ve nöronal hasara neden olmaktadır. Oksijenden kaynaklanan serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri hücrede, protein yapısının bozulmasına, lipid peroksidasyonuna ve nükleik asitlerin parçalanmasına neden olur. Hücreler, serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı, çeşitli enzimleri (katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz) ve çeşitli bileşikleri (askorbat, ürik asit, α - tokoferol, glutatyon) kullanarak doğal savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Reaktif oksijen türevlerinin hücre için hem faydalı hem zararlı etkileri vardır. Çok düşük konsantrasyonda, bazı sinyal olaylarında ikinci mesajcı gibi hareket ederler. Bununla beraber, ortamda aşırı derecede fazla bulduklarında, hücrenin birçok hayati organellerinin oksidatif hasara uğramasına neden olabilirler. Reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikaller apoptozis oluşumunda önemli rolleri vardır.

Hücrelerimiz aerobik solunumla enerji üretirken oksijene gerek duyduğu için serbest radikal oluşumu kaçınılmaz bir sonuçtur. Bu duruma organizma antioksidan olarak adlandırılan moleküllerle cevap verir.

Çalışmamızda doğal bir antioksidan olarak kullanılan Resveratrol ve metabolizmada doğal olarak üretilen NADH maddesi ve ticari bir ilaç olarak kullanılan Trimetazidin maddelerinin Retinal iskemi oluşturulmuş tavşanlarda iskemi ve Reperfüzyon aşamasında olan zararları ve zararlara karşı koruyucu etkisi araştırılması planlanmıştır.

Bu çalışma, Resveratrol, Trimetazidin ve NADH maddelerinin tavşanlara 30 gün boyunca verilmesi ile sonrasında oluşturulan retinal iskemi ve reperfüzyon aşamasında oluşan hasarlar incelendi. Hayvanlar rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. Gruplar, Kontrol (herhangi bir madde verilmeyen), Resveratrol + İ-R, Trimetazidin + İ-R ve NADH + İ-R olarak adlandırıldı. Resveratrol grubuna 25 mg/ml/kg, 48 saat aralıklar olmak üzere DMSO'da çözülmüş resveratrol, Trimetazidin grubuna saf suda çözülmüş günlük 10 mg/kg olmak üzere 12 saat aralıklarla 2 doz halinde, NADH

grubuna 10 mg/kg olmak üzere 24 saat aralıklarla olmak üzere madde verimi yapıldı. Deneyde hayvanların bir gözüne iskemi-reperfüzyon işlemi uygulanırken diğer gözü kontrol olarak kullanıldı. 24 saat reperfüzyon sonrasında hayvanlar kesildi. Daha sonrasında retinalar analizler için izole edildi. Homojenize edilen retina örneklerinde nitrik oksit (NO), ve apoptozis sonucu oluşan hasarlar incelendi. Ayrıca retinada HPLC ile iskemi sonucu oluşan enerji miktarlarındaki değişimler incelendi.

Çalışmada yapılan analiz sonuçlarında; gerek Nitrik oksit analizi sonuçlarında gerek Apoptozis çalışması gerekse de HPLC ile yapılan pürin analizleri sonuçlarında maddelerin iskemik süreçte oluşturmuş olduğu zararlara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. İskemi ve reperfüzyon sürecinde oluşan serbest radikaller çeşitli antioksidanlarla zararlı etkileri en aza indirildiği gözlemlenmiştir.

Yapılan apoptozis analizi sonucunda tüm iskemi gruplarında bantlaşma görülmüştür. Bu durum fizyolojik bir süreç olan apoptozis olgusunun tüm gruplarda hala devam ettiği ve iskemi reperfüzyon aşamasında oluşan hasarların etkisinin DNA kırıkları oluşmasını etkilediği gözlemlenmiştir.

HPLC ile yapılan pürin nükleotidleri ve enerji seviyelerindeki değişimler iskemi gruplarına göre madde verilen gruplarda iskemik süreçte azalan enerji miktarlarının verilen maddelerle bu azalmayı nispeten engellediği gözlemlenmiştir.

Retinal ischemia is a factor that causes vision loss and blindness. Free radicals which occur due to lack of glucose, oxygen and glutamate, are an important cause of retinal damage in ischemia.

Ischemia-reperfusion also change some parameter in organisms. These are free radical formation, change in purin quantities in cell and neuronal damage. free radical formation and neuronal damage. In general free radicals which are formed by oxygen and other forming free radicals can cause protein denaturation, lipid peroxidation and nucleic acid fragmentation in cells. Cells are developed natural defense system to protect them by the harmful effect of free radicals. These can be enzymes like catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and various compounds such as ascorbate, uric acid, α -tocopherol, glutathione. Free radicals generally have both beneficial and harmful effects for cells. In addition to this during some signaling events, they act as second messenger in very low concentrations, However, when they are present in high concentration, that can cause the cell to undergo oxidative damage in many vital organelles. Moreover reactive oxygen species and other free radicals have an important role in the formation of apoptosis. While our cells produce energy by aerobic respiration, oxygen is consumed and free radicals are an inevitable consequence of these reactions.

This condition is eliminated by some specific molecules named as antioxidant. During our research we planed that resveratrol (a natural antioxidant), NADH(a substance formed in metabolism naturally) and trimetazidine (a commercial medicine) were administrated in retinal ischemia-reperfusion formed rabbits to examine the damage of ischemia and reperfusion and we were also planed to examine protectif effect of our matter.

In this study, resveratrol, trimetazidine and NADH were given to rabbits for 30 days. After this administration retinal damage which forms during ischemia and reperfusion were examined. Animals were divided into 4 groups randomly. Groups are like that, the control (not to any substances), Resveratrol+I-R, Trimetazin+ I-R and NADH + I-R. Administration to the animal were made like that resveratrol group took 25 mg / ml / kg of resveratrol which was dissolved in DMSO and given to rabbits 48 hours intervals, trimetazidine group took 10 mg / kg doses of trimetazidine which dissolved in distilled water and 2 times in a day and 12 hour intervals, NADH group which took 10 mg / kg NADH with 24 hour intervals. In the study while one eye used for ischemia-reperfusion, the other eye used for control. . After 24 hour reperfusion rabbits are dissected. Later retinas were isolated for analyses.

Homojenized retinas samples were examined for nitric oxide and apoptosis damage. Moreover the change in energy amount which caused by ischemia were examined by HPLC in retina.

The analysis of the nitric oxide, apoptosis research and purine analyzes by HPLC show that our substances have a protective effect on ischemia and reperfusion. Free radicals effect were eliminated to minimum level by our substance which probably contains antioxidants.

In apoptosis analysis fragmentation was observed in all ischemia groups. This suggest apoptosis still forming and ischemia and reperfusion also cause DNA break.

Analyzes which made by HPLC show that during ischemia, experiment group nucleotides levels and energy level changed and when this change compare with control group, our substances are prevent the failure of energy in cells