

**T. C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GÖĞÜS KALP DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI  
PERFÜZYONİST YETİŞTİRME PROGRAMI**

**TİMOKİNON, SİLİMARİN VE CURCUMİN'İN  
DENEYSEL AORTİK İSKEMİ-REPERFÜZYON  
MODELİNDE TERAPÖTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Mustafa YARDIMCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa GÖZ

ŞANLIURFA  
2015

**T. C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GÖĞÜS KALP DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI  
PERFÜZYONİST YETİŞTİRME PROGRAMI**

**TİMOKİNON, SİLİMARİN VE CURCUMİN'İN  
DENEYSEL AORTİK İSKEMİ-REPERFÜZYON  
MODELİNDE TERAPÖTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mustafa YARDIMCI**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Mustafa GÖZ**

**ŞANLIURFA  
2015**

**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

Mustafa YARDIMCI'nın hazırladığı "Timokinon, Silimarin Ve Curcumin'in Deneysel Aortik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Terapötik Etkilerinin Araştırılması" konulu çalışma 31/03/2015 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek

Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalında Perfüzyonist Yetiştirme Programı **YÜKSEKLİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa GÖZ (Danışman)  
Harran Üniversitesi  
BAŞKAN

*M. Göz*

Doç. Dr. Abdussamed HAZAR  
Harran Üniversitesi  
ÜYE

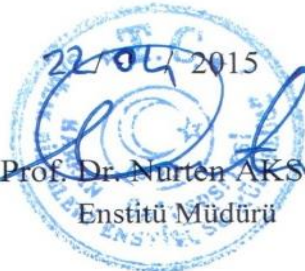
*A. Hazar*

Yrd. Doç. Dr. M. Salih AYDIN  
Harran Üniversitesi  
ÜYE

*M. Salih Aydın*

ONAY

22/04/2015  
*N. Aksoy*  
Prof. Dr. Nürten AKSOY  
Enstitü Müdürü



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve desteklerini esirgemeyen başta bölüm başkanımız ve danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa GÖZ'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Salih AYDIN'a, Sayın Doç. Dr. Abdussemed HAZAR'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Aydemir KOÇARSLAN'a, Sayın Prof. Dr. Nurten AKSOY'a ve Harran Üniversitesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına, Sayın Reşat DİKME ve Sami AKPİRİNÇ'e ve Ahmet KOLAĞASIOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve tezimin her aşamasında yanımda olan nişanlım Kübra DURMUŐ ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa YARDIMCI

2015

# İÇİNDEKİLER

## SAYFA NO

TEŞEKKÜR .....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
GRAFİK DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLO DİZİNİ.....	VII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÖZET.....	XI
ABSTRACT.....	XII
<b>1 GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2 TEMEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1 İskemi.....	4
2.1.1 Geri Dönüşümlü Zedelenme.....	5
2.1.2 Geri Dönüşümsüz Zedelenme.....	5
2.2 Reperfüzyon.....	6
2.3 Aort Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon Hasarı.....	7
2.4 İskemi Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları.....	8
2.4.1 Oksidatif Stres.....	9
2.4.2 Antioksidan Savunma.....	10
2.4.3 Total Antioksidan Seviye.....	12
2.4.4 Total Oksidatif Stres .....	13

2.4.5	Oksidatif Stres İndeksi.....	13
2.5	İskemi Reperfüzyon Hasarında Tedaviye Yönelik Uygulamalar.....	14
2.5.1	Antioksidan Terapi.....	14
2.5.2	Lökosit Terapi.....	14
2.5.3	İskemik Önkoşullama.....	15
2.5.4	Antitrombotik ve Fibrinolitik Terapi.....	15
2.5.5	Nitrik Oksit Terapisi.....	16
2.5.6	Herbal Terapi.....	16
2.5.6.1	Timokinon.....	16
2.5.6.2	Curcumin.....	18
2.5.6.3	Silimarin.....	19
<b>3</b>	<b>MATERYAL VE METOD</b>	<b>21</b>
3.1	Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	21
3.2	İskemi Reperfüzyon Hasarı Modeli.....	21
3.3	Tedavi Edici Ajanların Hazırlanması.....	22
3.4	Deney Grupları ve Protokol.....	22
3.5	Gastroknemius Kasının Histopatolojik İncelenmesi.....	23
3.6	TAS Ölçümü.....	23
3.7	TOS Ölçümü.....	23
3.8	OSİ Hesaplanması.....	24
3.9	İstatistiksel Analiz.....	24

<b>4</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>25</b>
4.1	Tedavi Edici Ajanların TAS, TOS ve OSİ Değerlerine Etkisi.....	25
4.2	Tedavi Edici Ajanların Histopatolojik Hasar Skorlarının Karşılaştırılması...	29
<b>5</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>36</b>



## GRAFİK DİZİNİ

Grafik	Sayfa No
4.1. Gruplar arası TAS değerlerinin karşılaştırılması.....	28
4.2. Gruplar arası TOS değerlerinin karşılaştırılması.....	28
4.3. Gruplar arası OSİ değerlerinin karşılaştırılması.....	29





## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
2.1. Glutasyonun İşlevi.....	13
2.2. Timokinonun Kimyasal Yapısı.....	18
2.3. Timokinonun Etki Alanları.....	19
2.4. Curcuminin Kimyasal Yapısı.....	20
2.5. Silimarinin Kimyasal Yapısı.....	21
4.1. Gastroknemius Kas Dokusunda İskemi Reperfüzyon Hasarının Histopatolojik Etkilerinin İncelenmesi.....	31

## TABLO DİZİNİ

Tablo

Sayfa No

4.1. Timokinon, Curcumin ve Silimarinin TAS (Trolox Equivalent/gr protein), TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equivalent/gr protein), OSİ (Arbitrary Units; AU) Değerleri Üzerine Etkisi..... 30



## KISALTMALAR

AAA	:	Abdominal Aortik Anevrizma
ATP	:	Adenozin Tri Fosfat
CABPG	:	Koroner Arter Bypass Grafting
CAT	:	Katalaz
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
ECM	:	Ekstrasellüler Matriks
GSH	:	Redükte Glutasyon
GSSG	:	Okside Glutasyon
GPx	:	Glutasyon Peroksidaz
GR	:	Glutasyon Redüktaz
GS	:	Glutasyon Sentetaz
GST	:	Glutasyon S-Transferaz
HIF-1	:	Hypoxia Inducible Factor-1
HO-1	:	Hem Oksijenaz-1
IAA	:	İnfrarenal Abdominal Aorta
ICAM	:	İnterselüler Adezyon Molekülü
İP	:	Periton İçi (intraperitoneal)
İRH	:	İskemi Reperfüzyon Hasarı
LOO-	:	Lipid Peroksit Radikali
MDA	:	Malon Dialdehid

MOF	:	Çoklu Organ Yetmezliği
MPT	:	Mitokondriyal Zar Geçirgenliğinin Değişimi
NAD	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NO	:	Nitrik Oksit
NOX-2	:	NADPH Oksidaz
OSI	:	Oksidatif Stres İndeksi
PAF	:	Trombosit Aktive Edici Faktör
PECAM	:	Adezyon Molekülü
PMNL	:	Polimorf Nüveli Lökositler
RAAA	:	Rüptüre Abdominal Aortik Anevrizmaları
SH	:	Sülfhidril
SIRS	:	Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
ROS	:	Reaktif Oksijen Türevleri
TAAA	:	Torakoabdominal Aortik Anevrizma
TAS	:	Total Antioksidan Seviye
tGSH	:	Total Glutasyon
TOS	:	Total Oksidatif Stres
OSİ	:	Oksidatif Stres İndeksi
VCAM	:	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
XD	:	Ksantin Dehidrogenaz

XO : Ksantin Oksidaz

$\gamma$ -GCS :  $\gamma$ -Glutamilsistein Sentetaz

$\gamma$ -GT :  $\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz



## ÖZET

### TİMOKİNON, SİLİMARİN VE CURCUMİN'İN DENEYSEL AORTİK İSKEMİ- REPERFÜZYON MODELİNDE TERAPÖTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Mustafa YARDIMCI**

Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı  
Perfüzyonist Yetiştirme Programı  
Yüksek Lisans Tezi

**Giriş:** Organ korunumuna ilişkin modern yaklaşımlar geliştirilmesine rağmen tıbbi anlamda torakoabdominal aorta cerrahisinde iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesine yönelik gelişmelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu anlamda cerrahlar bahsedilen hasarı önlemek için çeşitli yöntemler geliştirse de bu yöntemlerden hiç biri tek başına yeterli gelmemektedir.

**Amaç:** Bu çalışmada amaç timokinon, silimarin ve curcuminin, torakoabdominal aorta cerrahisiyle ilişkili iskemi reperfüzyon hasarına karşı antioksidant etkilerini belirlemektir.

**Materyal ve Metod:** Bu amaçla, toplam 25 Wistar albino ırkı sıçan her bir grupta 5 sıçan olacak şekilde sham, kontrol ve tedavi gruplarına ayrılmıştır. İnfrarenal aortada 120 dakika boyunca iskemi uygulanmış, reperfüzyon başlamadan peritoneal açıklıktan 20 mg/kg timokinon, 200 mg/kg silimarin ya da 200 mg/kg curcumin verilmiştir. 60 dakikalık reperfüzyon uygulaması sonunda sağ ventrikülden alınan kan dokusunda TAS, TOS ve OSİ ticari kitlerle fotometrik yöntemlerle, gastroknemius kas dokusunun histopatolojisi ise mikroskopik yöntemlerle araştırılmıştır.

**Bulgular:** Timokinon etkisinde oksidatif stres indeksi azalırken TAS ve TOS değişmemiştir. Silimarin etkisinde TAS, TOS ve OSİ azalmıştır. Curcumin TAS ve TOS'ta artışa neden olurken OSİ'de herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir. Gastroknemius kas dokusunda ise herhangi bir patoloji tespit edilmemiştir.

**Sonuç:** Sonuç olarak, deneysel aortik iskemi reperfüzyon modeli deneyinde TAS, TOS ve OSİ'de meydana gelen değişikliklere bağlı olarak kullanılan ajanların terapötik etkilerinin olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** İskemi/Reperfüzyon Hasarı, Timokinon, Silimarin, Curcumin

## ABSTRACT

# INVESTIGATION OF THERAPEUTIC EFFECTS OF THYMOQUINONE, SLYMARIN AND CIRCUMIN ON EXPERIMENTAL AORTIC ISCHEMIA REPERFUSION MODEL

**Mustafa YARDIMCI**

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery  
Training Program of Perfusionist  
Master's Degree Thesis

**Background:** Despite the developing of modern approaches for organ protection it is still needed to develop thoracoabdominal aorta surgery operations and to protect ischemia reperfusion injury. In this sense, even surgeons developed some methods to prevent that damages, however none of these methods are sufficient by itself.

**Aim:** Aim of this work is to determine antioxidant effect of thymoquinone, slymarin and curcumin on ischemia reperfusion injury that related with thoracoabdominal aorta surgery.

**Material and Method:** Totally, 25 Wistar albino rats were divided into the sham, control and treatment groups, each of those included 5 rats. Ischemia applied to the infrarenal aorta during thoracoabdominal aorta surgery for 120 minutes. Before the reperfusion, 20 mg/kg Thymoquinone, 200 mg/kg Slymarin or 200 mg/kg Circumin were given to the groups from peritoneal orifice of the rats. After application of reperfusion for 60 minutes, the whole blood was taken from right ventricles. Total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and oxidative stress index (OSI) in the serum derived from whole blood were studied with available commercial kits. Histopathology of the Gastrocnemius muscle tissue is investigated by microscopic methods.

**Findings:** Oxidative stress index levels in Thymoquinone group decreases ( $p < 0.05$ ) while TAS and TOS levels remain unchanged ( $p > 0.05$ ). TAS, TOS and OSI levels decrease in Slymarin group ( $p < 0.05$ ). Circumin leads to increase in TAS and TOS levels ( $p < 0.05$ ) though there is no change detectable in OSI levels ( $p > 0.05$ ). There is no pathological finding in the gastrocnemius muscle tissue.

**Conclusion:** As a result, on the experiment of aortic ischemia reperfusion model, it maybe assumed that thymoquinone, slymarin and curcumin have therapeutics effects on ischemia reperfusion injury regarding to TAS, TOS and OSI levels.

**Keywords:** Ischemia/Reperfusion Injury, Thymoquinone, Slymarin, Circumin

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İskemi reperfüzyon hasarı (IRH), intrasellüler hasarı ve zararlı enflamatuvar yanıt hasarını içeren kompleks bir fenomenondur. Her iki hasarın süreç ve olayları aynı patojenik ağlarla ilişkilidir. İskemik fazda anoksik hücre hasarı baskındır (1). İskemi, doku enerji kaynaklarının depleksiyonuna, proteazların aktivasyonuna ve iskemik hücre içerisine kalsiyum akışına neden olur (2). Azalan mitokondriyal ATP üretimi, hücre membranının seçici geçirgenliğinin kaybı ve hidrolazların aktivasyonu ile hücre sel iyon dengesini bozar. Tekrardan kanlanma (reperfüzyon) ile enflamatuvar yanıt başlamış olur (1, 2). Bu durum mikrodolaşımı bozar, apoptoza ve nekroza neden olur (2).

Hücre yaralanması, ya iskemik fazda başlamış olan hücre hasarının ya da enflamatuvar yanıtın bir sonucu olarak reperfüzyon fazında başlar. İntrasellüler zararlı oluşumlar, anoksik hücre hasarını içeren bu faz ile kısmen aynıdır. Ek olarak, intrasellüler sinyal kaskadlarının ve apoptotik mekanizmaların aktivasyonu da yer alabilir (1). IR-hasarının çeşitli organlarda etkisi; pro-enflamatuvar sitokin salınımı, enflamatuvar hücre infiltrasyonu, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretimi, nitrik oksit (NO) ifadesinde artış ve enflamatuvar transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu şeklinde kompleks metabolizmaları içerir (2,3)

Organ korunumuna ilişkin modern yaklaşımlara rağmen abdominal aortik anevrizmaların (AAA) tamirinde yapılan girişimler ciddi morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (26, 27). İskemi hasarına bağlı olarak gelişen sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS; systemic inflammatory response syndrome) ve çoklu organ yetmezliği (MOF; multiorgan failure) lokal veya uzak doku hasarına yol açarak abdominal aortik anevrizmalarında mortalite riskini artırmaktadır. Öyle ki anevrizmaya cerrahi müdahale yapılmazdan önce MOF sıklığı %3.8 iken cerrahi girişim sonrasında %64'e yükselmiştir (25).

İskemi reperfüzyon hasarı; serebrovasküler olay, şok, travma gibi bir çok hastalık ve trombolitik tedavi, koroner anjioplasti, transplantasyon, kardiyopulmoner bypass, anevrizma cerrahisi, periferik arter cerrahisi gibi cerrahi girişimler için ortak klinik tablodur. İ-R; artmış oksidan oluşumu, kompleman aktivasyonu, lökosit-endotel-platelet adezyon ve etkileşimi, mikrovasküler geçirgenlik artışı, endotel bağımlı vazodilatasyon disfonksiyonu ve inflamatuvar molekül (sitokin, kemokin) artışı ile karakterizedir (6,9). İ-R hasarının temel mekanizmaları;



oksidatif stres, lökosit-endotel etkileşimi, nötrofil-endotel etkileşimi ve apoptozistir (17). İ-R hasarının patofizyolojik süreci; hücre iskeletinin yapısının bozulması ve geçirgenliğinin artması, adenin nükleotid metabolizmasında değişmesi, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks (ECM) bağlantılarının kaybı, ROS üretimi, endotel aktivasyonunu takiben oluşan enflamatuvar yanıtın öncülük ettiği efektör hücrelerin infiltrasyonu ve nihayetinde apoptozun meydana gelmesi şeklindedir (21).

Aerobik canlılar ROS hasarına karşı koymak için birkaç mekanizmaya sahiptir. Antioksidant terimi herhangi bir maddenin hedef molekül üzerindeki oksidatif hasarı engellemesi ya da geciktirmesi şeklinde tanımlanır. Antioksidant aktivite gösteren birçok madde vardır; fakat iki temel sistemde kategorize edilebilir. ROS hasarından korunmada temel sistem oksidasyonu engelleyen enzimatik sistemdir, diğeri enzimatik olmayan antioksidant bileşiklerdir. Enzimatik sistem bütün radikalleri saf dışı bırakmaya çalışır; fakat oksidatif stres savunma mekanizmasının kapasitesinden yüksek ise savunma sisteminin ikinci hattı enzimatik olmayan antioksidant bileşikler devreye girebilir (50).

Herbal antioksidanlar, birçok çalışmada İ-R hasarını önlemek veya etkisini azaltmak amacıyla kullanılmış ve birçoğunda başarı sağlanmıştır. Üzümden elde edilen bir ekstrakt olan resveratrol iskemi ve reperfüzyondan önce uygun dozlarda uygulandığında redükte glutasyon (GSH) miktarının artmasını ve süper oksit dismutaz (SOD) ve katalaz CAT aktivitelerinin artmasını sağlamıştır. Herbal terapi genel olarak anti-enflamatuvar yanıt, kalsiyum kanalları ve SOD aktivitesine etkisi ile bilinmektedir (28).

Timokinon gıda hazırlanmasında katkı olarak, yanıklar, deri enfeksiyonları, eklem ağrıları, nemlendirici ve kırışik önleyici, diüretik, diyaforetik, stomasik, karaciğer kuvvetlendirici ve dijestif, diyare, hazımsızlık ve dispepside gibi pek çok farklı kullanım alanı bulmuştur. Yapılan fitokimyasal araştırmalarda uçucu yağda bulunan timokinon birçok biyolojik etkiden sorumludur (31, 33). Timokinon'un antioksidan, antihepatotoksik, antienflamatuvar ve analjezik, antikanserojenik, antimikrobiyal özellikleri ile ilgili in vitro ve in vivo çalışma mevcuttur (30, 31, 32, 33, 34)

Curcumin'in antienflamatuvar, antioksidan, antikanser, antiaterosklerotik, antimikrobiyal gibi çok fazla farmakolojik özelliğinden dolayı tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Bu etkilerini çok fazla sinyal molekülü ile etkileşime girme yeteneğiyle

yapmaktadır. Transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, enzimler, sitokinler ve protein kinazlar gibi çok sayıda molekülün hedefi olduğu belirlenmiştir (39).

Klasik olarak *Silybum marianum* bitkisinin ekstraktı olan silimarin tarih boyunca başlıca karaciğer ve gastro-intestinal hastalıkların tedavisinde kullanılmış olup günümüzde de siroz, kronik hepatitis, alkolle ilgili karaciğer hastalıklarında ve çeşitli çevresel toksik maddelere karşı kullanılmaktadır (41, 43, 44). Silimarinin hepatoprotektif özelliğini açıklamak için başlıca iki mekanizma öne sürülmektedir; antioksidan ve antiinflamatuvar mekanizmalar (41, 43).



## 2. TEMEL BİLGİLER

### 2.1. İskemi

Oksidatif fosforilasyonda kullanılan oksijen oksidatif streste de rol oynadığından oksijen hemostazı insan fiziolojisinde hayati önem taşımaktadır (5). İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin perfüzyon bozukluğuna bağlı dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır. Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen sunumu şeklinde tarif edilebilir. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir. Her iki durum da İ-R hasarının ilk kısmını oluşturmakta ve metabolizmanın anaerobik yöne kaymasıyla karakterizedir. Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla daha erken sonlanır ve hasar çok daha erken oluşur (6).

İskemi, akut veya kronik olabilir. Soğuk iskemi ile vücut dışında oluşan doku iskemisi, sıcak iskemi ile ise vücut içindeki doku iskemisi kastedilir. Dokuların sıcak ve soğuk iskemiyeye olan yanıtları farklıdır (7). İskemi evresinde, sıcak ve soğuk iskemi arasında oluşan hasar açısından bir farklılık olmamasına karşın reperfüzyon fazında sıcak iskemi ve soğuk iskemi arasında büyük farklılık vardır (1).

İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, differansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir. Sonuç olarak, hücrenel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolit birikimi hücre ölümüne yol açar (6).

Sonuç olarak, uzun süreli doku iskemisinde; hücrenel şişme, asidoz, iyon dağılım değişiklikleri (hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış), hipoksantin seviyesi artışı, adenozin trifosfat/fosfokreatin ve glutatyon düzeyi azalması, adenozin sinyal aktivitesi artışı, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid fosfohidrolizi (CD39 ve CD73 yoluyla) ve hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) çekirdek translokasyonu ile stabilizasyonu gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişim meydana gelir (8).

İskemi, perfüzyon bozukluğuna bağlı dolaşım tarafından oksijen sağlanamaması ve atık ürünlerin dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması, hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen sunumu

şeklinde tarif edilebilir. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir. Her iki durum da İ-R hasarının ilk kısmını oluşturmakta ve metabolizmanın anaerobik yöne kaymasıyla karakterizedir (6, 9).

### **2.1.1. Geri Dönüşümlü Zedelenme**

Hipoksi, hücre hasarı ve ölümünün en sık nedenlerinden biridir. Hipokside, hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksaması sonucu mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. ATP üretimi azalır ya da tamamen sona erer. ATP azalması ve sonucunda ATPaz aktivitesinin azalması hücre zarında bulunan aktif sodyum pompası yetersizliğini meydana getirir. Bunun sonucunda ise hücre içinde sodyum birikimi oluşur. Hücre içi potasyum dışarı atılır, hücre içerisine su girmeye başlar ve hücre sel şişme meydana gelir. Hücre sel şişmenin bir diğer nedeni ise katabolitlerin birikimidir. Hücrenin enerji metabolizması bu süreç içerisinde oksidatif metabolizmanın bozulmasından dolayı glikoza bağımlı hale gelir. Glikojen depoları hızla azalır. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine neden olur ve hücre içi pH düşerek asidoz oluşur. Sonrasında granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır, polizomlar monozomlara parçalanır ve protein sentezi azalır. Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları yavaşlar. Sonuçta hücre belirgin biçimde şişer. Bu olaylar geri dönebilir değişikliklerdir. İskemi devam ederse, geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar. Hücre hasarının yapısal değişiklikleri, bazı kritik biyokimyasal sistemlerin bozulmasından sonra görünür hale gelir. Hücre şişmesi geri dönüşümlü bir hasardır ve dakikalar içinde görülebilir.

Hücre ölümü, tam iskemiden 10-12 saat sonrasına kadar ışık mikroskobu ile görülmez. Geri dönüşümsüz hasar bugünkü bilgilerimize göre ilk 20-60 dakika içinde oluşur (10).

### **2.1.2. Geri Dönüşümsüz Zedelenme**

Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinde mitokondrilerde aşırı vakuolizasyon ile plazma zarında aşırı zedelenme vardır. Hasarlanmış ve ileri derecede geçirgenleşmiş zarlarda yaşamsal elemanların kaybolduğu görülür. Hücre içi pH'nın düşmesi, lizozom zarlarının

zedelenmesi ve beraberinde enzimlerin sitoplazmaya geçerek asit hidrolazları aktiflemesi sonucu, çekirdek ve sitoplazma yapıları sindirilir. Hücre zedelenmesinde en önemli basamak kuşkusuz membran zedelenmesidir. Hücre membran zedelenmesinde başlıca altı neden vardır;

1. Mitokondri fonksiyon bozukluğu,
2. Membran fosfolipidlerinin giderek artan kaybı,
3. Hücre iskeletindeki değişimler,
4. ROS,
5. Lipid yıkım ürünleri,
6. Hücre içi aminoasitlerin kaybı.

Membran zedelenmesi, hücreler arası mesafeden hücre içine doğru kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) tutulumuna neden olur. Reoksijenasyondan sonra mitokondri tarafından tutulan  $Ca^{+2}$  hücresel enzimleri inhibe ve proteinleri denature eder. Sonuçta koagülasyon nekrozuna özgü hücresel değişimler meydana gelir. İskemi sonrasında dokuda dolaşımın yeniden başlaması, reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. İskemi sonucunda artan ROS kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açar. Reperfüzyon oluşmazsa, öldürücü iskemik zedelenme gelişir fakat toksik ROS oluşmaz. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi  $Ca^{+2}$  birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen türevlerinin büyük ölçüde iskemik alanda toplanan lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir (10).

## **2.2. Reperfüzyon**

İlk defa 1975 yılında Cerra ve arkadaşları tarafından tanımlanan reperfüzyon, iskemik dokuların nekrozdaki kurtulması için kesinlikle gereklidir (11,12). Fakat kan akımının yeniden sağlanması paradoksik şekilde iskemi hasarına ek olarak yeni hücresel hasarlara yol açabilir (6, 9, 12, 13, 14, 18).

İskemi fazını takiben reperfüzyonla birlikte bir enflamatuvar yanıt oluşur. Bu enflamatuvar yanıt; makrofajlar, endoteliyal hücreler, nötrofiller, lenfositler, trombositler ve parankimatik hücreler gibi hücrel elemanları kapsadığı gibi, kompleman sistem, kan pıhtılaşma kaskadı, ROSlar, nitrik oksit, pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinleri içeren hücrel olmayan elemanları da kapsar (1, 13, 15).

İskemi fazında hücre içi ATP kaynaklarının tükenmesine bağlı olarak hücre içinde  $Ca^{+2}$  artışı olur. Hücre içi kalsiyumun artış hızı ve miktarı, hasarı etkileyen en önemli ve erken mekanizma olup, hücre nekroz ve apoptozuyla direkt ilgilidir. Artmış mitokondriyal kalsiyum, oksijenin suya olan dördüncü seviyeden redüksiyonunu engelleyerek birinci derece redüksiyon ve radikal oluşumuna neden olur ve iskemik dokuda ATP'yi daha fazla azaltıp hasarı derinleştirir (6). Reperfüzyon fazındaki hücre hasarı, özellikle erken reperfüzyon fazında, iskemik fazda meydana gelen hücreler arası değişikliklerin bir sonucu olabilir (16,17).

Artmış hücre içi kalsiyum, bir proteaz enzim olan kalpain aktivasyonunu ve dolayısıyla ksantin dehidrogenaz (XD) enziminin ksantin oksido-redüktaz (XO) enzim formuna dönüşümünü sağlar. Doku iskemisi sırasında, enzimin XO formu baskın hale gelir ancak XO aktivitesi oksijen gerektirdiği için iskemik dokuda XO birikimi olur. Dolayısıyla, iskemik dönemde, hipoksiye bağlı, hipoksantin ve XO birikimi söz konusudur. Reperfüzyon döneminde ise, oksijen sunumuyla birlikte XO aktivasyonu ve hipoksantinden toksik oksijen radikalleri oluşur. XO enzim seviyesi ve aktivitesi, türden türe ve dokudan dokuya farklılık gösterir. Endotel ve gastrointestinal sistem mukoza villus yapısı, vücutta diğer dokulara oranla daha fazla XO enzim aktivitesine sahip olup, İ-R hasarına en hassas dokulardır (6).

### **2.3. Aort Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon Hasarı**

Organ korunumuna ilişkin modern yaklaşımlara rağmen abdominal aortik anevrizmaların(AAA) tamirinde yapılan girişimler ciddi morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (26, 27). İskemi hasarına bağlı olarak gelişen sistemik enflamatuvar yanıt sendromu (SIRS; systemic inflammatory response syndrome) ve çoklu organ yetmezliği (MOF; multiorgan failure) lokal veya uzak doku hasarına yol açarak rüptüre abdominal aortik anevrizmalarında (RAAA; ruptured abdominal aortic aneurysm) mortalite riskini artırmaktadır. Öyle ki

anevrizmaya cerrahi müdahale yapılmazdan önce MOF sıklığı %3.8 iken cerrahi girişim sonrasında %64'e yükselmiştir (25). Torakoabdominal aortik anevrizmalarına (TAAA; thoracoabdominal aortic aneurysm) yapılan cerrahi girişimler de oldukça kompleks ve zorlu müdahalelerdir. Bu girişimlerin neticesinde solunum yetmezliği, böbrek yetmezliği, nörolojik hasar ve hatta ölüm bile beklenebilir. Tüm bu sonuçlar İR-hasarına bağlı olarak gelişen sistemik enflamatuvar yanıtın sonuçları olarak ortaya çıkmaktadır. Yetersiz veya sonlanmış heparin uygulaması sonucu oluşan mikrotrombuslar, aortik klemping ile gelişen iskemi ile ilişkilidir. Mikrotrombus oluşumu MOF gibi histopatolojik ve fonksiyonel değişiklikleri de beraberinde getirir. Bu girişimlerde tek sorumlu aort klempide değildir. Antikoagülasyon için kullanılan heparin doğrudan antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Heparinin antiinflamatuvar ve antikoagülasyondaki rolü çeşitli enzimler, hormonlar, biyojenik aminler ve plazma proteinleriyle ilişkilidir (26).

#### **2.4. İskemi/Reperfüzyon Hasar Mekanizmaları**

İskemi reperfüzyon hasarı; serebrovasküler olay, şok, travma gibi bir çok hastalık ve trombolitik tedavi, koroner anjioplasti, transplantasyon, kardiyopulmoner bypass, anevrizma cerrahisi, periferik arter cerrahisi gibi cerrahi girişimler için ortak klinik tablodur. İ-R; artmış oksidan oluşumu, kompleman aktivasyonu, lökosit-endotel-platelet adezyon ve etkileşimi, mikrovasküler geçirgenlik artışı, endotel bağımlı vazodilatasyon disfonksiyonu ve inflamatuvar molekül (sitokin, kemokin) artışı ile karakterizedir (6, 9). İ-R hasarı sırasında lökosit, endotel, T lenfosit, monosit ve platelet aktivasyon ve hücreler arası etkileşimleri gerçekleşmekte olup, hasarın genişlemesinde lökosit-endotel ve lökosit-platelet etkileşimleri merkezi rol oynar (20). İskemi/reperfüzyon hasarının temel mekanizmaları; oksidatif stres, lökosit-endotel etkileşimi, nötrofil-endotel etkileşimi ve apoptozistir (17).

İskemi reperfüzyon hasarının patofizyolojik süreci; hücre iskeletinin yapısının bozulması ve geçirgenliğinin artması, adenin nükleotid metabolizmasında değişmesi, hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks (ECM) bağlantılarının kaybı, ROS üretimi, endotel aktivasyonunu takiben oluşan enflamatuvar yanıtın öncülük ettiği efektör hücrelerin infiltrasyonu ve nihayetinde apoptozun meydana gelmesi şeklindedir (21).

### 2.4.1. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, ROS oluşumu ile antioksidant savunma kapasitesi arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanan, ROSların hücrel membran lipidleri, proteinler ve DNA gibi makromoleküller üzerinde hasar yapma etkisini kapsamaktadır (47, 48, 49). Aerobik canlılar için olmazsa olmaz bir element olan oksijen, bazı durumlarda bu canlılara zarar verebilmektedir. Oksijenin olası zararlı etkilerinin birçoğu diğer maddeleri okside etme kapasitesi yüksek olan ROS oluşumu ve aktivasyonundan dolayıdır (50). Biyolojik sistemlerde birçok çeşidi bulunan ROS, oluşum yerlerine, fizyolojik işlevlerine, reaktifliklerine ve biyolojik yarı ömürlerine göre ayrılabilir (51). ROS; süperoksit radikal anyonu ( $O_2^{\bullet-}$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikalleri ( $\cdot OH$ ) gibi inorganik moleküller veya alkoksil ve peroksil radikalleri gibi organik moleküller şeklinde de ayırmak mümkündür (47, 52, 53).

Reaktif oksijen türleri, enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerin sonucu olarak hücrede sürekli meydana gelir (50). Hücrede ROS'un yaklaşık %5'i elektron transfer zincirinde  $O_2$ 'nin indirgenmesi sırasında oluşur, bu ROS'un birinci hücrel kaynağıdır. Bazı oksidasyon enzimleri ROS oluşumuna katkıda bulunur; bu ikinci hücrel kaynaktır. Diamin oksidaz, triptofan dioksijenaz, ksantin oksidaz ve sitokrom P450  $O_2^{\bullet-}$  oluşumuna katkıda bulunurken, guanil siklaz ve glukoz oksidaz  $H_2O_2$  oluşumuna katkıda bulunur. Bazı ksenobiyotikler, mitokondriyal elektron transport zincirinin ya da antioksidant enzimlerin inhibisyonu yoluyla hücredeki ROS oluşumunu artırır; bu da hücrede üçüncü ROS kaynağıdır (54).

Elektron transfer zincirinde, oksijen dört elektronla indirgendikten sonra sitokrom c oksidaza aktarılır. Oksijenin bir elektronla indirgenmesi ve sonra elektronların bir kısmının akıştan kaçması sonucu bir ROS öncülü olan  $O_2^{\bullet-}$  anyonu oluşur.  $O_2^{\bullet-}$  anyonu hızlıca  $H_2O_2$ 'e dönüştürülür ve  $H_2O_2$ , mitokondri membranından dışarıya kolayca difüze olur (55).  $H_2O_2$  metal iyonlarının katalizlediği tepkimelerle  $\cdot OH$ 'ne dönüşür (92).

Reaktif oksijen türleri bir sinyal molekülü olarak rol oynamasına karşın bazı apoptotik mekanizmaları tetikleyen DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu gibi hücrel hasar süreçlerinde de yer alır (53). ROS Parkinson, Alzheimer, katarakt, cilt yaşlanması, astım vb.



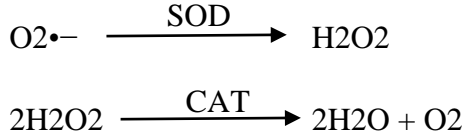
birçok hastalığa neden olabildiği gibi İ-R hasarının nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır (50).

Oksidatif stres koşullarında, poliansatüre yağ asitlerince zengin olan hücre ve organel membranlarında bulunan lipidlerin oksidatif modifikasyonları ile hücrenin bir ve iki valanslı elektronlara geçirgenliği artmakta, membran enzimleri inhibe olmakta ve hatta lizozim gibi yapıların içeriği boşaltılarak hücrenin sindirimi başlamaktadır. Bu nedenle biyolojik membranlardaki peroksidasyonun kontrol edilememesi membran yapısı ve işlevini bozarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır (56).

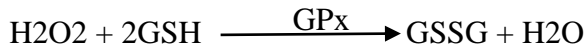
#### **2.4.2. Antioksidant Savunma**

Aerobik canlılar ROS hasarına karşı koymak için birkaç mekanizmaya sahiptir. Antioksidant terimi herhangi bir maddenin hedef molekül üzerindeki oksidatif hasarı engellemesi ya da geciktirmesi şeklinde tanımlanır. Antioksidant aktivite gösteren birçok madde vardır; fakat iki temel sistemde kategorize edilebilir. ROS hasarından korunmada temel sistem oksidasyonu engelleyen enzimatik sistemdir, diğeri enzimatik olmayan antioksidant bileşiklerdir. Enzimatik sistem bütün radikalleri saf dışı bırakmaya çalışır; fakat oksidatif stres savunma mekanizmasının kapasitesinden yüksek ise savunma sisteminin ikinci hattı enzimatik olmayan antioksidant bileşikler devreye girebilir (50). Antioksidant enzimler; katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), glutatyon redüktaz (GR; EC 1.8.1.7), glutatyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9) ve glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) ile enzimatik olmayan antioksidantlar, redükte glutatyon (GSH), vitamin E, vitamin C, tiyoredoksin vd. kapsar (57).

Süperoksit dismutaz enzimi açığa çıkan  $O_2\cdot^-$ 'yi  $H_2O_2$ 'ye dönüştürürken, aerobik organizmaların peroksizomlarında bulunan CAT enzimi, açığa çıkan  $H_2O_2$ 'yi su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir (58; 59). CAT, GPx enziminin aksine  $H_2O_2$ 'nin detoksifikasyonu için hücre sel indirgeyicilere gereksinim duymaz ve bu iki enzim yarışma halindedir (60; 61).



Glutatyon peroksidaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında substrat olarak kullandığı GSH'nin elektronlarını H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye aktarır ve GSH'nin GSSG'ye oksidasyonunu katalizler (62; 63). Selenyum bağımlı bir enzim olan GPx lipid peroksidleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin indirgenmesinde önemli bir role sahiptir (64).

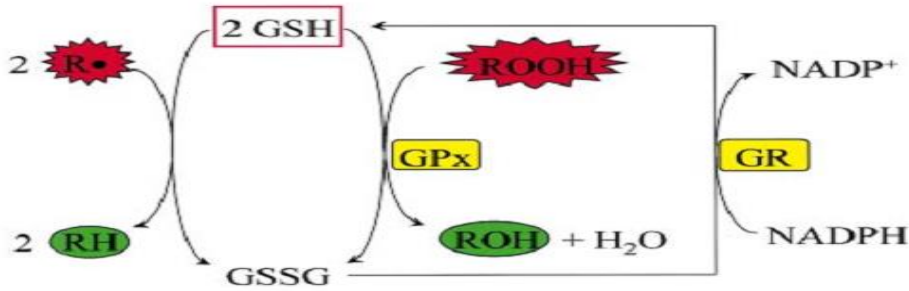


Glutatyon S-transferaz, başlıca ksenobiyotiklerin ve karsinojenlerin detoksifikasyonunda yer alır ve merkaptürik asit oluşumunun ilk basamağını katalizler. Organik hidroperoksitlerin birçok formuna ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı aktif değildir (62). GST varlığında, elektrofilik metabolitler ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda GSH geri dönüşümsüz olarak tüketilir (65).



Tiyol grupları içeren antioksidant savunma bileşenleri ROS-aracılıklı oksidatif hasardan korunmada ikincil savunma hattını oluşturmaktadır (66). GSH ( $\gamma$ -glutamilsisteinilglisin), antioksidant savunmada yer alan protein olmayan bir tiyol bileşiğidir (47).  $\gamma$ -Glutamilsistein sentetaz ( $\gamma$ -GCS; EC 6.3.2.2), glutatyon sentetaz (GS; EC 6.3.2.3) gibi sentez enzimleri, GPx, GR ve GST gibi işlevinde yer alan enzimler ile  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz ( $\gamma$ -GT; EC 2.3.2.2) gibi intra ve interselüler transportunda yer alan enzimlerin hepsi birden glutatyon redoks sistemini oluşturmaktadır (67). Son çalışmalar GSH'nin; sinyal iletimi, hücre çoğalması ve gen ekspresyonu ile apoptozun düzenlenmesinde rol aldığını öne sürmektedir. GSH, ayrıca, DNA metabolizması, protein sentezi, çeşitli enzimlerin aktivasyonu ve immün sistemin desteklenmesi gibi bir takım hücresel süreçlerde de rol oynar (68).

Glutasyon hücrede 2 ana formda bulunur; redükte glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG). Tiyol grubu (-SH) GSH'in en reaktif grubudur. Bir ya da iki elektron oksidasyon tepkimelerinde yer alır (67). GSH'in *de novo* sentezini  $\gamma$ -GCS sağlamaktadır (69). GSH hücrede serbest ya da proteinlere bağlı şekilde bulunabilir. Serbest glutasyon genel olarak redükte haldedir ve oksidatif stres süresince GPx katalizli enzimatik ya da non-enzimatik GSSG'ye dönüşür (70; 71). GR aracılığıyla NADPH varlığında GSH'a indirgenir (69; 70). Redükte ve okside glutasyon oranı (GSH/GSSG) oksidatif stresin belirlenmesinde önemli bir parametredir (70). Yoğun oksidatif stres koşullarında GSH/GSSG oranını korumak amacıyla GSSG, oluştuğu zaman hücre membranından dışarı salınır ve hücrede net GSH kaybı meydana gelir (72; 71). Bu nedenle kanda ya da ekstraselüler sıvıda ölçülen GSSG miktarı dokunun ya da hücrenin oksidatif stres durumunun anlaşılmasında önemlidir (72). Hücresel total GSH (tGSH) miktarının hücresel oksidatif stres durumunu belirten duyarlı bir parametre olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (73; 74).



Şekil 2.1: Glutasyonun işlevi (93)

### 2.4.3. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Normal şartlarda organizma, endojen ve/veya eksojen nedenlerle meydana gelen serbest radikaller ve bu radikallere bağlı olarak gelişen oksidatif stres ile mücadele eden karmaşık bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı antioksidan savunma sistemlerinin çalışarak serbest radikallerin temizlenmesinde kan çok önemlidir. Antioksidanlar kan ile vücudun tamamına taşınır ve dağıtılır (22). Total antioksidan kapasitenin büyük bir kısmı plazmada bulunan antioksidan moleküllerle oluşturulur. Serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi antioksidanların yanında serbest radikalleri

kapalı zincir kırıcı antioksidanlar da plazmada bulunmaktadır. Albümin, ürik asit ve askorbik asit gibi antioksidanlar ise plazmadaki total antioksidan seviyenin % 85'inden fazlasını meydana getirir. Çünkü bu antioksidanlar bilirubin,  $\alpha$ -tokoferol, flavinoidler, indirgenmiş glutatyon ve  $\beta$ -karoten gibi antioksidanlara oranla plazmada daha yüksek seviyelerde bulunur. Antioksidanlar plazmada kendi aralarında da etkileşim içindedirler. Bu etkileşimler sayesinde antioksidanlar tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla antioksidan etki gösterebilmektedir. Glutatyonun askorbatı, askorbatın da  $\alpha$ -tokoferölü yeniden aktifleştirmesi bu sinerjistik etkiye örnek olarak gösterilebilir. Bundan dolayıdır ki total antioksidan durumun belirlenmesi antioksidanların ayrı ayrı ölçülerek belirlenmesinden çok daha değerlidir (23,24).

#### **2.4.4. Total Oksidatif Stres (TOS)**

Vücudumuzda mevcut oksidan ve antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu meydana gelen patolojik durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stresin toplam değeri Total Oksidatif Stres (TOS) olarak ifade edilir. Bu durum, aşırı miktarda reaktif oksijen radikali ve/veya nitrojen radikallerinin oluşumu veya antioksidan tampon sisteminin yetersizliği sonucu ortaya çıkar. Reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin seviyelerindeki artış ise hücrelere toksik etki yapar ve hücrenin lipit, protein ve DNA benzeri moleküllerine zarar verir. Bu gibi durumlarda damar endoteli daha az oranda etkilenir. (23, 24).

#### **2.4.5 Oksidatif Stres İndeksi (OSI)**

Total oksidanların seviyelerinin, total antioksidanların seviyelerine bölünmesiyle elde edilen oransal bir indekstir ve OSI değerinin yüksek olması oksidatif stresin arttığı durumlarda ortaya çıkar (45,46).

## 2.5. İskemi Reperfüzyon Hasarında Tedaviye Yönelik Uygulamalar

### 2.5.1. Antioksidan Terapi

Glutatyon redoks döngüsü, antioksidan savunmanın enzimatik basamağına ek olarak İ-R hasarında farklı antioksidan terapötik uygulamalar mevcuttur. Nötrofiller ve Kupffer hücreleri doğrudan NADPH oksidaz (NOX-2) üzerinden ROS üretmektedir. NOX-2 inhibitörlerinin kullanımı ile İR-hasarı büyük ölçüde azaltılmaktadır (6,28).

Mitokondriyal zar geçirgenliğinin değişimi (MPT; Mitochondrial permeability transition) ROS'lar aracılığıyla olmaktadır. MPT'nin engellenmesi hepatik İR-hasarını büyük ölçüde azaltmaktadır (28).

Vitamin A, C ve E tek başlarına verildiklerinde etkili serbest radikal temizleyicisi değildirler. Fakat vitamin A ve E birlikte hayvan modellerinde verildiğinde lipid peroksidasyonunu azaltırlar. Vitamin E ile birlikte prostasiklinin hayvan deneylerinde kas fleplerine uygulanması lipid peroksidasyonunu azaltarak reperfüzyon hasarını azaltır (13). Vitamin E analogu  $\alpha$ -tocopherol insanlarda doğrudan emilmektedir. Oral  $\alpha$ -tocopherol uygulamasının iskemi sonrası ATP üretimi artırdığı belirlenmiştir (28).

Ubiquinon'un (Koenzim Q10) yapılan son çalışmalarda, reperfüzyon dönemi serbest oksijen radikali patlamasını direkt antioksidan etkiyle engellediği ve endotel bağımlı vazodilatasyon üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (29).

Bunların dışında; karvedilol, Allopurinol (XO inhibitörü), Quercetin (FB277), nikaravan, alipoik asit, thioredoxin, N asetilsistenin, ve kalsiyum kanal blokörleri ile İR hasarında azalma tespit edilmiştir (6).

### 2.5.2. Lökosit Terapisi

Lökosit aracılı İR hasarı azaltılmasında; inflamatuvar aracı maddeler, adezyon molekülleri ve lökosit-endotel adezyonuna yönelik terapötik yaklaşımlar kullanılmaktadır (8). Trombosit aktive edici faktör (PAF; platelet activated factor), histamin, LT-B4 ve TNF- $\alpha$  gibi aracı inflamatuvar maddelerin sentez veya reseptör etkileşimlerinin engellenmesi ile İR-hasarında fayda sağlanmıştır. Aspirin, glukokortikoidler, altın tuzları ve D-penisilamin gibi

anti-inflamatuar ilaçlar; NF-κB ve activator protein-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu engelleyerek, lökosit adezyon molekülü sentezi veya sitokin oluşumunu azaltırlar. Lökosit endotel etkileşiminin engellenmesi bir diğer yaklaşım şeklidir. Lökosit adezyon moleküllerine yönelmiş monoklonal antikolar veya çözülebilir serbest adezyon molekülleri (PSGL-1, sialyl-Lewisx, ICAMI ), lökosit-endotel adezyonunda etkin yapıların blokajı ve inaktivasyonunu sağlarlar (6).

### **2.5.3. İskemik Önkoşullanma**

İskemi reperfüzyon hasarının etkilerinin azalmasında iskemik koşullanma oldukça etkilidir. İskemik koşullanma, iskemi sürecinin özeti şeklindedir ve organ savunmasının ve enflamatuvar yanıtın modülasyonunu sağlayarak İR-hasarının etkilerini azaltır. İskemik koşullanmanın mekanizması komplekstir ve çeşitli metabolizmaları içerir. İskemik koşullanma, GSH, SOD ve hem-oksijenaz-1 (HO-1) gibi doğal antioksidantları artırır ve lipid peroksidasyon düzeyini azaltır. Pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini ve salınımını sağlayan nükleer transkripsiyon faktörleri de iskemik koşullanma tarafından düzenlenir. Ek olarak, sinüzoidal kan akımı, oksijenizasyon ve mitokondriyal fonksiyonun korunumunu sağlayan NO iskemik koşullanma tarafından düzenlenir. Bu olaylar sayesinde dokular İR-hasarına dayanıklı hale gelir (4).

### **2.5.4. Antitrombotik ve Fibrinolitik Terapi**

Heparin; antitrombotik etkinliğinin yanı sıra anti-inflamatuar etkinliğe de sahiptir. Anti-inflamatuar etkileri; P ve L selektine bağlanarak lökosit-endotel etkileşiminin engellenmesi, NF-κB inhibisyonu sağlayarak inflamatuvar kaskadın bozulması ve lökositlerden ROS oluşumunun engellenmesidir. Venöz kılcallarda; endotel-lökosit etkileşimi, trombosit kümeleşmesi ve mikrotrombüs oluşumunu engelleyerek “no reflow” fenomeni etkinliğini azaltır. Rekombinant insan doku faktörünün de heparin kadar etkili olduğu gözlenmiştir (6, 13). Etkin bir fibrinolitik olan tissue plasminogen activator’ün İR’da uygulanımı sonrası, lökosit adezyon ve diapedezinde azalmaya bağlı, doku inflamasyon ve ödeminde azalma saptanmıştır (6).

### **2.5.5. Nitrik Oksit Terapisi**

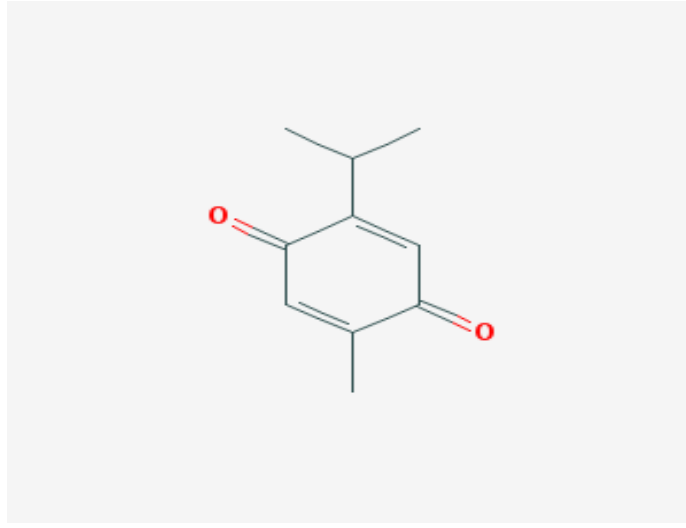
İnhaler veya serum fizyolojikte çözülmüş olarak tatbik edilen NO gazın, hayvan deneylerinde, İ-R hasarını ve lökosit adezyonunu azalttığı saptanmıştır. Ayrıca selektif NOS inhibitörü kullanımı da ayrı bir seçenektir (6).

### **2.5.6. Herbal Terapi**

Herbal antioksidanlar, birçok çalışmada İ-R hasarını önlemek veya etkisini azaltmak amacıyla kullanılmış ve birçoğunda başarı sağlanmıştır. Üzümden elde edilen bir ekstrakt olan resveratrol iskemi ve reperfüzyondan önce uygun dozlarda uygulandığında GSH miktarının artmasını ve SOD ve CAT aktivitelerinin artmasını sağlamıştır. Herbal terapi genel olarak anti-enflamatuvar yanıt, kalsiyum kanalları ve SOD aktivitesine etkisi ile bilinmektedir (28).

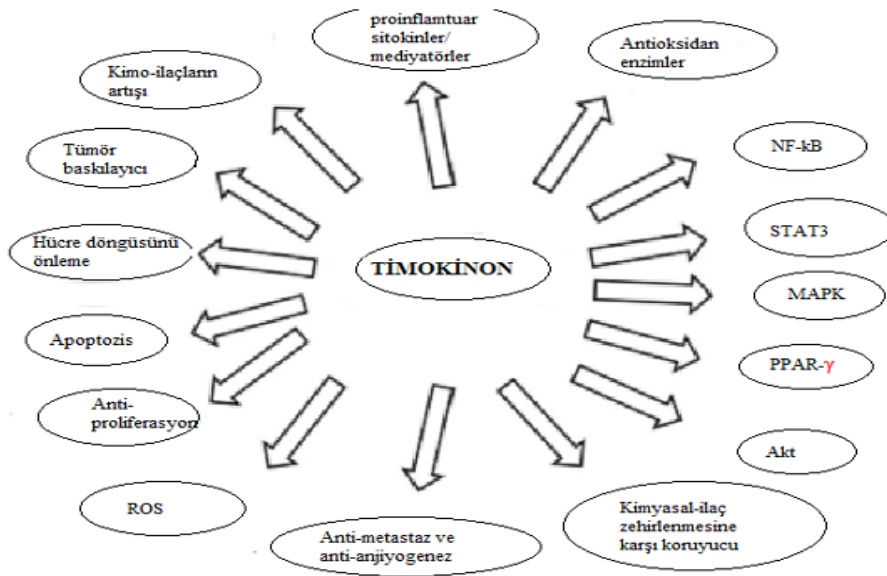
### **2.6. Timokinon**

*Nigella sativa* geçmişten günümüze, Orta Doğu ve Uzak Doğu'da doğal bir ilaç olarak kullanılmıştır. Gıda hazırlanmasında katkı olarak, yanıklar, deri enfeksiyonları, eklem ağrıları, nemlendirici ve kırışik önleyici, diüretik, diyaforetik, stomasik, karaciğer kuvvetlendirici ve dijestif, diyare, hazımsızlık ve dispepside gibi pek çok farklı kullanım alanı bulmuştur. Yapılan fitokimyasal araştırmalarda uçucu yağda bulunan timokinon birçok biyolojik etkiden sorumludur (31, 33). Timokinon (thymoquinone; p-Cymene-2,5-dione, p-Mentha-3,6-diene-2,5-dione, 2-Isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone), *N. sativa* bitkisinden elde edilen bir monoterpen kinon bileşimidir (30, 31, 32, 33). *N. sativa*'nın ana bileşeni timokinon olmakla birlikte timol ve ditimokinon bileşikleri de eşlik etmektedir (31, 33).



Şekil 2.2: Timokinon'un kimyasal yapısı (PubChem-CID 10281) (34, 38)

Timokinon, kimyasal yapısı  $C_{10}H_{12}O_2$  şeklinde olan uçucu bir yağdır (30). Timokinon'un antioksidan, antihepatotoksik, antiinflamatuvar ve analjezik, antikanserojenik, antimikrobiyal özellikleri ile ilgili in vitro ve in vivo çalışma mevcuttur (30-34). Kuvvetli bir OH radikali süpürücüsü olan timokinon SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzim aktivitelerini ve GSH miktarını artırarak antioksidan özelliğini ortaya koyar (31).

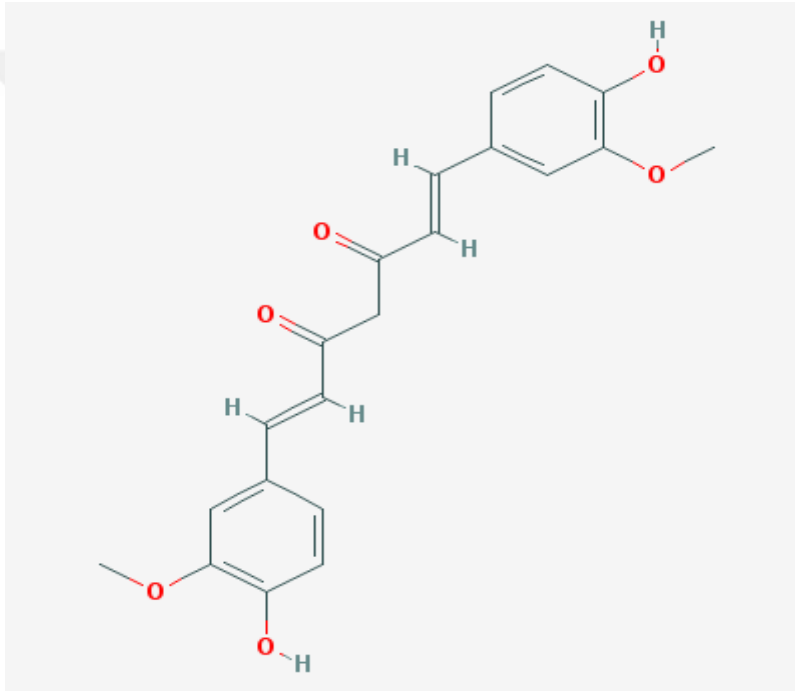


Şekil 2.3: Timokinon'un etki alanları (31).



## 2.7. Curcumin

Curcumin, hint safranı (zerdeçal) olarak bilinen *Curcuma longa* bitkisinin kök kısmından elde edilen, parlak sarı renkte polifenol türevi bitkisel bir ekstraktır (35,36,37,39). *C.longa* bitkisi Asya tıbbında binlerce yıldır kullanılmasına karşın; yaklaşık %8'ini oluşturan curcumin ilk defa 1910 yılında keşfedilmiştir (35). Diferuloylmethane, Natural yellow 3, Turmeric yellow, Turmeric şeklinde de isimlendirilen curcuminin (IUPAC: (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione) molekül ağırlığı 368.3799'dır ve kimyasal formülasyonu C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> şeklindedir (37).



Şekil 2.4: Curcumin'in kimyasal yapısı (37)

Curcumin'in antiinflamatuvar, antioksidan, antikanser, antiaterosklerotik, antimikrobiyal gibi çok fazla farmakolojik özelliğinden dolayı tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Bu etkilerini çok fazla sinyal molekülü ile etkileşime girme yeteneğiyle yapmaktadır. Transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, enzimler, sitokinler ve protein kinazlar gibi çok sayıda molekülün hedefi olduğu belirlenmiştir (39).

Asidik ve nötral pH'da antioksidan etkisi yanında siklooksijenaz, GST üzerine etkileri, immün modülasyon etkisi, angiogenesis ve hücre-hücre adezyon etkisi vardır. Gen

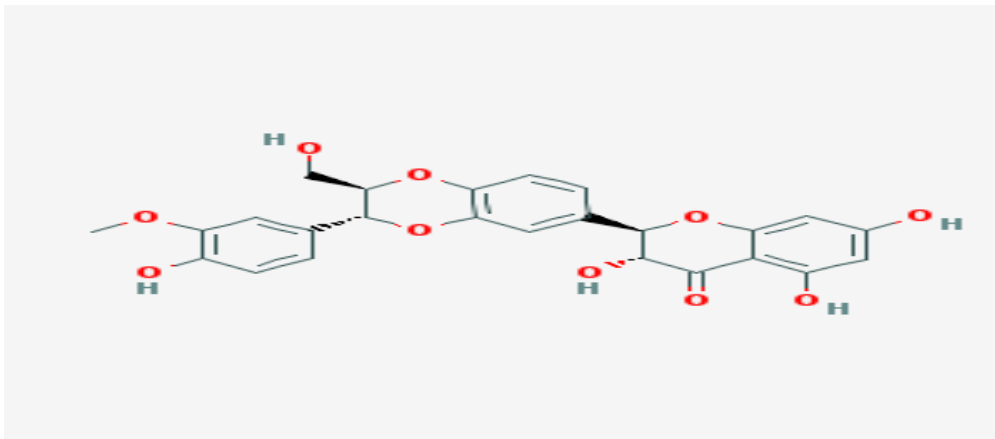
transkripsiyonu ve apoptozisi indükleyerek kanser hastalarında olumlu etkileri görülmüştür. Özellikle kolon ve rektum kanserindeki olumlu etkileri faz II çalışmalarında gösterilmiştir. Barsak ve karaciğerde curcumin glukuronid ve curcumin sülfata konjuge edilir ya da heksahidrocurcumine indirgenir. Fakat metabolitleri aynı biyolojik aktiviteye sahip değildir (35,36). Toksik etkileri yoktur ve çok miktarda verilebilir (36,39).

Shen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada antioksidan metabolizmasını tetikleyip, nötrofil infiltrasyonunu ve ROS oluşumunu azalttığı belirlenmiştir. Reperfüzyon sonrası NOS aktivitesi azalmış, endoteliyal NOS aktivitesi etkilenmemiştir (40).

## 2.8. Silimarin

Silybum marianum L. Gaertn. (devedikeni), Asteraceae familyasına ait bir bitkidir. Silimarin (ayrıca; slymarin, legalon, carsil, D012838 olarak da bilinir), Silybum marianum (Meryemana diken) bitkisinin tohumlarından elde edilen karmaşık bir bileşik olup başlıca komponentini slybin oluşturmakla beraber yapısında diğer flavolignanlardan isosilybin, silychristin, silydianin ve flavonoid bir yapı olan taxifolinden oluşur. Slybin, silimarin kompleksi içinde en etkin antihepatotoksik madde olarak bilinir (41, 42).

Silimarin (IUPAC ismi: (2R,3R)-3,5,7-trihydroxy-2-[(2R,3R)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl]-2,3-dihydrochromen-4-one), molekül ağırlığı 482.43618, molekül formülü C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub> olan flavolignan bir bileşiktir (42).



Şekil 2.5: Silimarin'in kimyasal yapısı (42).

Klasik olarak silybum marianum bitkisinin ekstraktı olan silimarin tarih boyunca başlıca karaciğer ve gastro-intestinal hastalıkların tedavisinde kullanılmış olup günümüzde de siroz, kronik hepatitis, alkolle ilgili karaciğer hastalıklarında ve çeşitli çevresel toksik maddelere karşı kullanılmaktadır (41, 43, 44). Silimarinin hepatoprotektif özelliğini açıklamak için başlıca iki mekanizma öne sürülmektedir. İlki kuvvetli serbest radikal süpürücü (41), ROS ve lipid peroksidasyonu azaltıcı özelliklerinden dolayı antioksidan etkisine dayandırılmaktadır. İkinci mekanizma ise NF- $\kappa$ B modülasyonu, NO modülasyonu ve COX-2 ifadesinde azalmadan dolayı anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik mekanizmalardır. Ayrıca; antiviral ve antifibrotik etkilerinin de olduğu bilinmektedir (43).



### **3. MATERYAL VE METOD**

Çalışmamız Dollvet etik kurul onayı (07/12/2014 tarihli 2014/62 sayılı etik kurul onayı) alındıktan sonra, Çevre ve Orman Bakanlığı tarafından Resmi Gazete'nin 6 Temmuz 2006 tarih ve 2622 sayılı nüshasında yayımlanan Hayvan Deneyleti Etik kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına dair Yönetmelik ile Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleti Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun olarak gerçekleştirildi.

#### **3.1 Çalışma Gruplarının Oluşturulması**

Ortalama ağırlıkları 250-300 gr. olan 25 adet Wistar-albino cinsi sıçan randomize olarak eşit sayıda (n = 5) 5 gruba ayrıldı. Sıçanlar çalışma öncesinde oda sıcaklığında ve 12 saat ışık 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Tüm sıçanlar standart koşullar altında şebeke suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Girişimden 8 saat önce tüm sıçanların beslenmesi kesildi.

#### **3.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı Modeli**

Denyde kullanılan tüm sıçanlara 8 saat açlık sonrasında Ketamin 87 mg/kg intraperitoneal olarak (Ketalar; Parke Davis, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve Xylazine 13 mg/kg (Rompun; Bayer AG, Leverkusen, Germany) dozlarında yapıldı. Gerekli olduğunda deney süresince bir kez olmak üzere ek doz yapılması planlandı. Ciltleri aseptik olarak hazırlanan sıçanlara orta hat laparotomi yapıldı. Barsakların ıslak gazlı bez yardımıyla uzaklaştırılması ardından, infrarenal abdominal aorta (IAA), dikkatli bir şekilde explore edildi. İAA'ya, travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp konuldu. 120 dakika sonra İAA'daki mikrovasküler klemp kaldırıldı ve 60 dakika süreyle reperfüzyon sağlandı. Aortik iskemi; klempleme işlemi sırasında distal aortada pulsasyonun kaybolmasıyla, aortik reperfüzyon ise; klempin kaldırılması sonrası distal aortada pulsasyonun geri gelmesiyle onaylandı. Kontrol grubunu oluşturacak sıçanlarda laparotomi ve abdominal aort diseksiyonu eşit sürede (120 dakika) uygulandı ancak bu grupta İ-R oluşturulmadı. İ-R dönemlerinde peritoneal boşluktan ısı ve sıvı kaybını en az miktara indirmek için; İAA'ya klemp konulması

ve kaldırılması sonrası dönemlerinde, peritoneal boşluğa serum fizyolojik uygulanıp, batin insizyonu geçici olarak ıslak gazlı bez ile sarılarak kapatıldı. Reperfüzyon süresi sonunda; tüm sıçanlarda, median laparotomi kesisi yukarıya doğru ilerletilerek mediasten açıldı, kalbe ulaşıldı ve 5 cc'lik enjektör yardımıyla sağ ventriküler boşluktan kan alındı. Sonrasında sağ gastroknemius kas doku örneği alındı. Kas doku örnekleri; immunohistokimyasal ve hematoksilen-eosin değerlendirme yapılıncaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Sıçanlardan alınan kanlar, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve sıçan plazma örnekleri biyokimyasal analizler yapılıncaya kadar -20 derecede saklandı.

### **3.3. Tedavi Edici Ajanların Hazırlanması**

Timokinon ve silimarin serum fizyolojik (SF) kullanılarak, curcumin ise %1'lik dimetil sülfoksit (DMSO) intraperitoneal enjeksiyon için hazırlandı.

### **3.4. Deney Grupları ve Protokol**

Beş grup oluşturuldu.

**Grup 1** (Sham, n=5): Çalışma boyunca anestezi uygulaması dışında hiç bir işlem gerçekleştirilmedi. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

**Grup 2** (Kontrol, İR, n=5): Anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaya 120dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı, ilaç verilmedi. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

**Grup 3** (İR + Thymoquinone (TQ) n=5): Anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaya 120 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı. İskemi sonlandırıldıktan hemen sonra 20 mg/kg timokinon uygulandı. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

**Grup 4** (İR + Silimarin n=5): Anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaya 120 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı. İskemi sonlandırıldıktan hemen sonra 200

mg/kg silimarin uygulandı. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı

**Grup 5** (İR + Curcumin n=5): Anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaya 120 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı. İskemi sonlandırıldıktan hemen sonra 200 mg/kg curcumin uygulandı. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı

### **3.5. Gastroknemius Kasının Histopatolojik İncelenmesi**

Histopatolojik inceleme için kas dokuları ayrı ayrı %10'luk tamponlu nötral formaldehit çözeltisinde fikse edildi. Örnekler parafin bloklara gömüldü. 5 mikronmetrelik kesitler alındı. Hematoksilen eozin boyası ile boyandı. 20 objektiflik büyütme kullanıldı. Solez ve ark. (18) tarafından kullanılan skorum sistemiyle böbrek hasarının şiddeti skorlandı. Yok:0 var:1 belirgin:2 olarak kabul edildi. Her örnek için tüm parametre skorları toplanarak histolojik skor belirlendi.

### **3.6. TAS Ölçümü**

Örneklerin TAS düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilir (45).

### **3.7. TOS Ölçümü**

Örneklerin TOS düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanılır. Sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equivalent/L olarak ifade edilir (76).

### 3.8. OSİ Hesaplanması

Örneklerin OSI hesaplanırken TAS değerleri 10 ile çarpılarak TOS ile birimler eşitlenir. Örneklerin içerdiği TOS düzeylerinin, örneklerin içerdiği TAS oranı OSI olarak belirtildi (77). Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi.

$$\text{OSİ} = \frac{\text{(TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.)}}{\text{(TAS, mmol trolox Equiv. / L.)}} \times 100$$

### 3.9. İstatistiksel Analiz

Biyokimyasal analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 17.0 paket programında (SPSS Inc., Chicago, IL, A.B.D.) yapılmıştır. Sürekli bir değişken yönünden ikiden çok bağımsız grup arasında farklılık olup olmadığını incelemek için  $P < 0.05$  önem derecesinde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testinde önem gösteren parametrelerde sürekli bir değişken yönünden bağımsız iki grup arasında fark olup olmadığını test etmek için Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır. (75).

## 4. BULGULAR

Bu çalışmada Wistar-albino cinsi sıçanlarda tedavi edici ajanlar olan; timokinon, silimarin ve curcuminin gastroknemius kas dokusunda iskemi-reperfüzyon hasarına ve kan dokusunda TAS, TOS ve OSİ değerlerine etkileri araştırılmıştır.

### 4.1. Timokinon, Silimarin ve Curcuminin TAS, TOS ve OSİ değerlerine etkisi

Timokinon, silimarin ve curcuminin TAS, TOS ve OSİ parametrelerine etkisi Tablo 4-1 ve Şekil 4-1, Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'de gösterilmiştir.

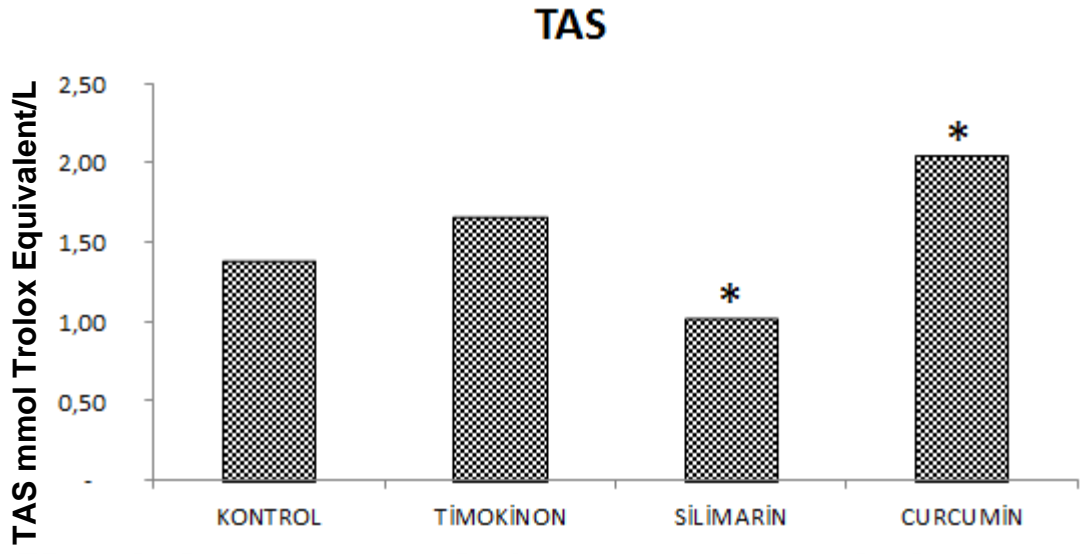
Kontrol grubunda sham grubuna göre TAS değişmezken, TOS ve OSİ'de sırasıyla %95 ve %104 artış belirlenmiştir.

Timokinon uygulanan grupta TAS'ta bir değişiklik belirlenmezken, silimarin etkisinde %27 azalma curcumin etkisinde ise %48 artış belirlenmiştir.

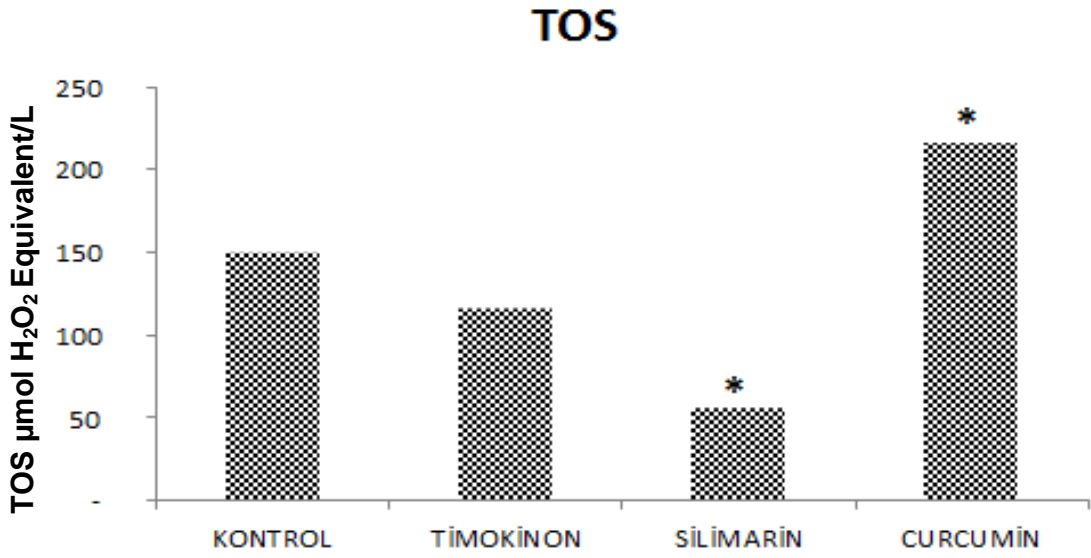
Timokinon etkisinde değişiklik belirlenmeyen TOS silimarin etkisinde %63 azalmış curcumin etkisinde ise %45 artmıştır.

Oksidatif stres indeksi timokinon ve silimarin etkisinde sırasıyla %33 ve %49 azalırken curcumin etkisinde bir değişiklik belirlenmemiştir.

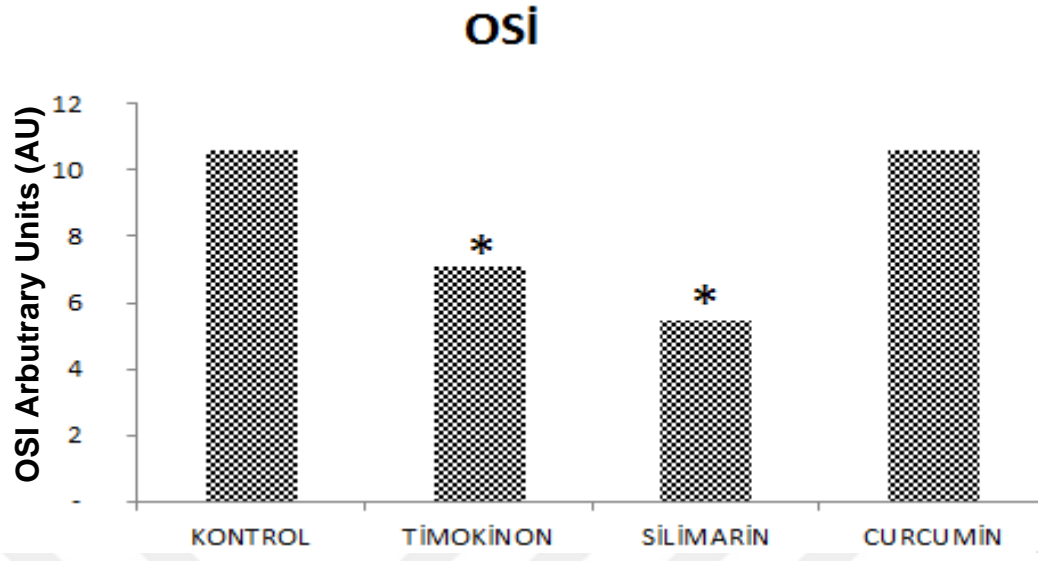




Şekil 4.1: Gruplar arası TAS değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.2: Gruplar arası TOS değerlerinin karşılaştırılması.



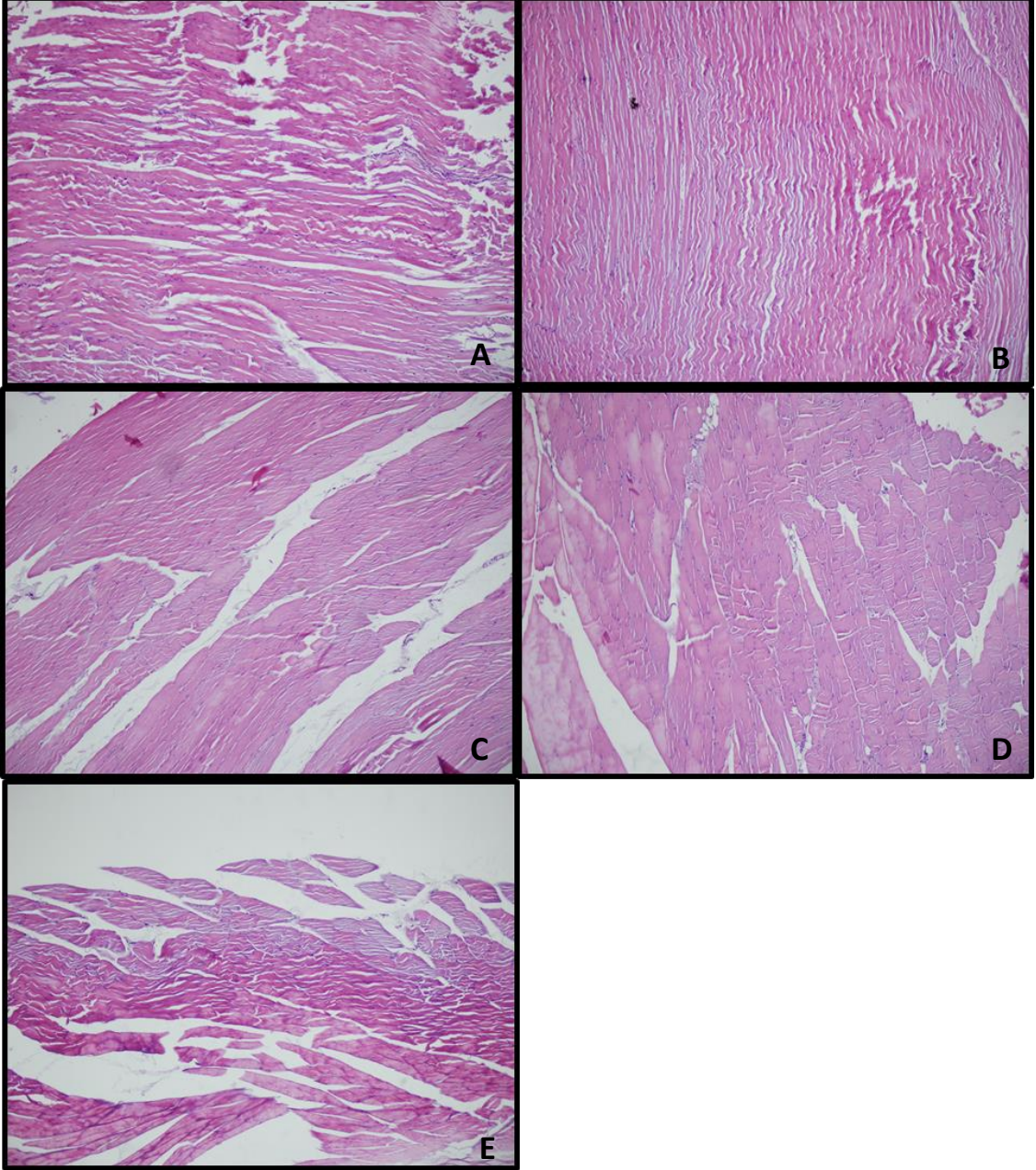
Şekil 4.3: Gruplar arası OSİ değerlerinin karşılaştırılması.

	TAS	TOS	OSİ
SHAM	1.47±0.14 <sup>a</sup>	77.11±10.08 <sup>a</sup>	5.22±0.36 <sup>a</sup>
KONTROL	1.39±0.08 <sup>a</sup>	150.16±19.96 <sup>b</sup>	10.63±0.90 <sup>b</sup>
TİMOKİNON	1.66±0.16 <sup>ab</sup>	117.12±11.09 <sup>b</sup>	7.09±0.25 <sup>c</sup>
SİLİMARİN	1.02±0.07 <sup>c</sup>	55.81±7.72 <sup>c</sup>	5.45±0.68 <sup>d</sup>
CURCUMİN	2.05±0.09 <sup>b</sup>	217.23±32.01 <sup>d</sup>	10.62±1.46 <sup>bc</sup>

Tablo 4.1: Timokinon, Curcumin ve Silimarinin TAS (Trolox Equivalent/gr protein), TOS( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equivalent/gr protein), OSİ (Arbitrary Units; AU) değerleri üzerine etkisi.  $\bar{X} \pm S\bar{x}$  = Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart hata. a, b, c ve d harfleri gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ( $N=5$ ).

#### 4.2. Gastroknemius Kas Dokusunda Timokinon, Silimarin ve Curciminin İskemi-Reperfüzyon Hasarına Etkisi

Oluşturulan İRH üzerine uygulanan tedavi edici ajanlardan hiç biri kas dokusunda anlamlı olarak bir etki göstermemiştir. Mikroskopik inceleme sonucu elde edilen fotoğraflar Resim 4.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1:** Gastroknemius kas dokusunda İRH'nin histopatolojik hasar oluşturma etkisinin incelenmesi.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda iskemi ve reperfüzyon sonrası, gastroknemius kas dokusunda İ-R hasarı üzerine timokinon, silimarin ve curcuminin etkilerini araştırmayı amaçladık.

Cerrahi operasyonların hemen hepsinde alternatifi olmayan bir uygulama olan klemp işlemi cerrahi sahada birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajların yanı sıra birçok yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır. Oluşturduğu iskemi ve sonrasında yaptığı İ-R hasarı ile bulunduğu alandaki doku ve organlarda enerji düzeyinin düşmesi, toksik metabolitlerin birikimi, hücre fonksiyon bozuklukları ve hücre ölümüne varan biyokimyasal reaksiyonları başlatır.

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin perfüzyon bozukluğuna bağlı dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması olarak tanımlanır. İskemi, metabolizmanın anaerobik yöne kaymasıyla karakterizedir. İskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması erken sonlanır ve hasar çok daha erken oluşur (6).

İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, differansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir. Kısa süreli iskemide dakikalar içerisinde görülebilen hücre şişmesi meydana gelir. İskemi devam ederse, geri dönüşsüz hücre zedelenmesi başlar. Hücre hasarının yapısal değişiklikleri, bazı kritik biyokimyasal sistemlerin bozulmasından sonra görünür hale gelir (6, 8, 10).

Kan akımının yeniden sağlanması şeklinde tanımlanan reperfüzyon, paradoksik şekilde iskemi hasarına ek olarak yeni hücre hasarlarına yol açabilir. Hoffman ve ark. (2004), reperfüzyon hasarının, iskemi fazında meydana gelen hücreler arası bir değişikliğin sonucu olduğunu düşünmektedir (17). Tekin (2007), bu hasarı etkileyen en önemli faktörün ATP kaynaklarının tükenmesiyle artan kalsiyumun hücre içi artış hızı ve miktarı olduğunu belirtmektedir (6).

İskemi reperfüzyon hasarının patofizyolojik süreci; hücre iskeletinin yapısının bozulması ve geçirgenliğinin artması, adenin nükleotid metabolizmasında değişmesi, hücre-

hücre ve hücre-ekstraselüler matriks (ECM) bağlantılarının kaybı, ROS üretimi, endotel aktivasyonunu takiben oluşan enflamatuvar yanıtın öncülük ettiği efektör hücrelerin infiltrasyonu ve nihayetinde apoptozun meydana gelmesi şeklindedir (21).

İskemi reperfüzyon hasarında tedaviye yönelik; antioksidan terapi, lökosit terapisi, iskemik önkoşullanma, antitrombotik ve fibrinolitik terapi, nitrik oksit terapisi, herbal terapi gibi bir çok uygulama mevcuttur. Çalışmamızda bu uygulamalardan herbal terapi yöntemini denedik.

Timokinon, *Nigella sativa* bitkisinden elde edilen bir monoterpen kinon bileşimidir (30,32). Kuvvetli bir OH radikali sürücüsü olan timokinon SOD, CAT, GPx enzim aktivitelerini ve GSH miktarını artırarak antioksidan özelliği ortaya koymaktadır (31). Timokinon'un antioksidan, antihepatotoksik, antiinflamatuvar ve analjezik, antikanserojenik, antimikrobiyal özellikleri ile ilgili birçok in vitro ve in vivo çalışma mevcuttur.

Hossainzadeh ve ark. (2012), timokinonun bacak iskelet kasında İ-R hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. 2 saatlik iskemi sonrası 1 saat reperfüzyona maruz bırakılan sıçanlarda TBARS miktarında azalma ve tiyol (SH) gruplarında artış olduğunu belirtmektedirler (78).

Nemmar ve ark. (2011) intratrakeal timokinon uygulamasının DEP indüklü kardiyovasküler değişimleri önlediğini, bununla birlikte plazma SOD aktivitesini artırdığını ve trombosit sayısındaki azalmayı önlediğini bildirmiştir (79).

Kuvvetli bir radikal süpürücü olan timokinonun çeşitli mekanizmalar ile antioksidan özelliği gösterdiği ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği bildirilmektedir (80).

*Nigella sativa* bitkisine ait diğer bileşiklerden daha çok antioksidan etki gösterdiği bildirilen timokinonun, sıçanlarda koroner, serebral ve periferel damar hastalıklarında risk oluşturan hiperhomosisteinemiye karşı koruma sağladığı belirtilmiştir (81, 82).

Sıçanlarda civa klorür tarafından indüklenen renal oksidatif hasarın önlenmesinde timokinonun apoptozis ve proliferatif reaksiyonları azalttığı ve inorganik civa intoksikasyonunun sebep olduğu akut renal yetmezliğin korunmasında klinik önemi olduğu bildirilmektedir (83).

Çalışmamızda timokinonun OSİ'yi düşürdüğünü ayrıca TOS'u azalttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ve TAS'ı değiştirmedğini belirledik. Bizim çalışmamıza paralel olarak Gökçe ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada sıçan testis dokusunda timokinonun TOS ve OSİ değerlerini azalttığı fakat TAS'ı değiştirmedğini belirlemişlerdir (84).

Curcumin, *Curcuma longa* bitkisinin kök kısmından elde edilen, parlak sarı renkte polifenol türevi bitkisel bir ekstraktır. *C.longa* bitkisi Asya tıbbında binlerce yıldır kullanılmasına karşın; yaklaşık %8'ini oluşturan curcumin ilk defa 1910 yılında keşfedilmiştir (35). Antienflamatuvar, antioksidan, antikanser, antiaterosklerotik, antimikrobiyal gibi çok fazla farmakolojik özelliğe sahiptir. Bu özelliği sinyal molekülleri ile etkileşime girerek gerçekleştirmektedir. Transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, enzimler, sitokinler ve protein kinazlar gibi çok sayıda molekülün hedefi olduğu belirlenmiştir. Antioksidan, immün modülasyon ve anjiyogenetik etkilere sahiptir. Ayrıca apoptozu indükleyerek kanser tedavisinde olumlu etkileri bulunduğu bildirilmiştir (35, 36, 39).

Wang ve ark. (2012) curcuminin kollojen ve fibröz doku sentezini artırarak miyokard kütlelerini artırdığını, miyokard dokusunda ekstrasellüler matriksi bozulmalarına karşı koruduğunu ve MDA düzeyini azalttığını bildirmişlerdir. Kardiyak fonksiyonları koruduğundan dolayı kalp krizi riski taşıyan hastaların diyetlerinde kullanması gerektiğini önermişlerdir (85).

Fan ve ark. (2014), curcuminin İ-R hasarı sonucu artan karaciğer ALT ve AST düzeylerini düşürdüğü, azalan SOD aktivitesini artırdığını belirlemişlerdir. Curcuminin antioksidan ve antiienflamatuvar etkisini NF-κB metabolizmasını inhibe ederek gösterdiğini bildirmişlerdir (86).

Çalışmamızda curcumin etkisinde TOS'un kontrol grubuna göre artış gösterdiğini OSİ'nin ise değişmediğini belirledik. Aydın ve ark. (2014), abdominal aorta İ-R modeli oluşturmuş ve TOS ve OSİ değerlerinin kontrol grubuna göre azaldığını bildirmişlerdir (87). Bu durumun araştırmacıların uzun tuttuğu reperfüzyon süresinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Curcuminin İ-R hasarında; sıçan ovaryumunda oksidatif stresi azalttığı (88), mezenterik İ-R hasarında, intestinal dokuda histopatolojik hasarı önlediği, MDA ve diğer oksidatif stres parametreleri düşürdüğü belirlenmiştir (89).

Silimarin, *Silybum marianum* (Meryemana diken) bitkisinin tohumlarından elde edilen karmaşık bir bileşik olup başlıca komponentini silybin oluşturmaktadır (41,42). silimarin tarih boyunca başlıca karaciğer ve gastro-intestinal hastalıkların tedavisinde kullanılmış olup günümüzde de siroz, kronik hepatitis, alkolle ilgili karaciğer hastalıklarında ve çeşitli çevresel toksik maddelere karşı kullanılmaktadır (41, 43, 44). Silimarinin hepatoprotektif özelliğini açıklamak için başlıca iki mekanizma öne sürülmektedir. İlki kuvvetli serbest radikal süpürücü (41), ROS ve lipid peroksidasyonu azaltıcı özelliklerinden dolayı antioksidan etkisine dayandırılmaktadır. İkinci mekanizma ise NF-κB modülasyonu, NO modülasyonu ve COX-2 ifadesinde azalmadan dolayı anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik mekanizmalardır (43).

Çalışmamızda silimarin TOS ve OSI'yi sırasıyla %63 ve %49 oranında azaltmıştır. Bu etkisini, kuvvetli bir ROS süpürücü özelliğinden (41) ve karaciğer metabolizmasını güçlendiren hepatoprotektif bir madde (41, 43, 44) olduğundan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Altaei (2012), koroner arter bypass grafting (CABPG) ameliyatı sırasında silimarin uygulandığını ve TAS ve MDA düzeylerinin azalıp GSH düzeyinin arttığını bildirmiştir ve bu uygulamanın CABPG ameliyatı geçiren hastaları İ-R hasarından ve enflamasyondan koruyacağını belirtmektedir (90).

Hou ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada silimarinin İ-R indüklü beyin hasarına karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar silimarinin bu etkisini NF-κB ve STAT-1 aktivasyonunu bozarak gösterdiğini düşünmektedirler (91).

Sıçanlarda abdominal aortaya travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp konularak oluşturduğumuz bu İ-R deney modelinde, pek çok çalışmada antioksidan özelliği kanıtlanan timokinon silimarin ve curcuminin deneyimizde de bu özelliğini gösterdiğini düşünmekteyiz. Tedavi edici 3 ajan karşılaştırıldığında silimarinin etkisi göze çarpmaktadır. Silimarinin bu etkisinde çözücü olarak kullanılan DMSO'nun hem prooksidan hem antioksidan olarak çift yönlü karakterli olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Azalan TOS ve OSI'nin yanında TAS'ın da azalması bu fikrimizi desteklemektedir.

Gastroknemius kas dokusunda tüm gruplarda hiç bir histopatolojik değişim meydana gelmemiştir. Daha önce yapılan birçok çalışma mevcut olmasına karşın çalışmamızda böyle



bir değişiklik olmamasının nedenini, iskemi ve reperfüzyon sürelerinden ve gastroknemius kas dokusunun İ-R hasarına karşı duyarlı olmayışından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Kumar ve ark (2004) Hücre ölümünün, tam iskemiden 10-12 saat sonrasına kadar ışık mikroskobu ile görülmeyeceğini bildirmişlerdir(10). Bu durum hiç bir histopatolojik değişim olmamasının iskemi ve reperfüzyon sürelerinin düşük olmasından kaynaklanması fikrini destekler niteliktedir.



## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sıçanlarda abdominal aorttaya travmatik olmayan bir mikrovasküler klemp konularak oluşturduğumuz İR deney modelinde elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde;

Sıçanlarda klemp ile abdominal aortta oluşturduğumuz deneysel İR sonucu oksidatif stres oluşmakta ve buda lokal hasar oluşturmaktadır. Bunun üzerine Timokinon, silimarin ve curcumin verildiğinde biyokimyasal olarak antioksidan özelliği ile İR hasarında her birinin koruyucu özellik gösterdiği düşüncesindeyiz

Kalp Damar cerrahisi operasyonlarda pratikte kullanılan klemp uygulaması iskemi altındaki doku ve reperfüzyondan sonra meydana gelen İR nedeniyle uzak doku ve organlarda oksidatif stresten dolayı etkilenmektedir. Timokinon, silimarin ve curcumin ile yapılan diğer bilimsel çalışmalarda ve yaptığımız hayvan deneyinde de antioksidan özelliği ile bu etkiyi azalttığı görülmektedir.

Ayrıca çalışmamıza ekleyeceğimiz birkaç değişik kategorinin timokinon, silimarin ve curcuminin antioksidan ve histopatolojik hasarı önleyici özellikleri hakkında bize daha detaylı ve faydalı bilgiler vereceğini düşünmekteyiz.

Düşündüğümüz bu yöntemlerden ilki, intraperitoneal uygulama yanı sıra terapötik ajanları oral formda da denemek. Oral yolla uygulanan ajanların *i.p.* yolla uygulanan ajanlara göre değişiklik farkı bize uygun uygulama yöntemi hakkında fikir vereceğini düşünmekteyiz.

Yine çalışmamıza kalpte iskemi hasarını gösteren kreatinin fosfokinaz, kreatinin kinaz MB gibi ekleyeceğimiz birkaç biyokimyasal parametre ile bu ajanların histopatolojik hasarı engellemedeki etkinliği hakkında önemli bilimsel veriler vereceği düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak; yaptığımız çalışmada uygulanan ajanların antioksidan özellikleri ile iskemi reperfüzyona bağlı gelişen İR hasarını anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür.

Klinikte meydana gelen oksidatif stres endekslerini ve hücre hasarlarını timokinon, silimarin ve curcuminin ayrı ayrı klinik alanlarda kullanılmasıyla tedavi edilebileceği kanaatindeyiz. Ancak bu maddelerin klinik tedavide kullanılabilmesi için gelecekte yapılacak daha kapsamlı bilimsel prelinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. De Grooth H., Rauen U. Ischemia-Reperfusion Injury: Processes in Pathogenetic Networks: A Review. *Transplantation Proceedings*, 2007, Volume 39(2), 481-484.
2. Camara-Lemarrooy C.R. Remote ischemic preconditioning as treatment for non ischemic gastrointestinal disorders: Beyond ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2014 April 7; 20(13): 3572-3581.
3. Abu-Amara M., Yang S.Y., Tapuria N., Fuller B., Davidson B., Seifalian A. Liver Ischemia/Reperfusion Injury: Processes in Inflammatory Networks-A Review. *Liver Transplantation*; 2010, 16:1016-1032.
4. Eisen A., Fisman E.Z., Rubenfire M., Freimark D., McKechnie R., Tenenbaum A., Motro M., Adler Y. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. *Atherosclerosis* 172 (2004); 201–210.
5. Semenza GL. Perspectives on oxygen sensing. *Cell*: 1999, 98(3): 281-284.
6. Tekin İ., İloprost'un Deneysel Aortik İskemi-Reperfüzyon Modelinde Femoral Arter Endoteli ve Gastroknemius Kası Hasarı Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2007.
7. McMichael M., Moore R.M. Ischemiareperfusion injury pathophysiology, part I. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2004; 14 (4): 231–241.
8. Eltzhig H.K., Collard C.D. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin*, 2004; 70: 71-86.
9. Siemionow M., Arslan E. Ischemia/Reperfusion Injury: A Review In Relation To Free Tissue Transfers. *Microsurgery* 2004; 24: 468–475.
10. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.

11. Cerra F.B., Lajos T.Z., Montes M., Siegel J.H. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery*.1975; 78(1): 95-104.
12. Quiñones-Baldrich W.J., Chervu A., Hernandez J.J. , Colbum M., Moore W.S. Skeletal muscle function after ischemia: “No reflow” versus reperfusion injury. *Journal of Surgical Research*; 1991, 51(1): 5-12.
13. Özcan A. Deri Flebi Modelinde İskemik Önkoşullama ve İskemik Ardkoşullamanın Flep Sağkalımı Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, II. Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2009.
14. Mangino M.J. Anderson C.B. Murphy M.K. Brunt E., Turk J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*; 1989, 257; 299-307.
15. Zweier J.L., Talukder M.A.H. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 2006, 70; 181 – 190.
16. Buja L.M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Pathology*, 2005, 14; 170–175
17. Hoffman J.W., Gilbert T.B., Poston R.S., Silldorf E.P. Myocardial Reperfusion Injury: Etiology, Mechanisms and Therapies.
18. Solez K, Racusen LC. Role of the renal biopsy in acute renal failure. *Contrib Nephrol*. 2001;(132):68-75.
19. Papadopoulos D., Siempis T., Theodorakou., Tsoulfas G. Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury and Trauma: Current Concepts. *Archives of Trauma Research*. 2013; 2(2): 63-70.
20. Xu Y., Huo Y., Toufektsian M.C., Ramos S.I., Ma Y., Tejani A.D., French B.A., Yang Z. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290: 692–699.

21. Bagul A., Frost J.H., Drage M. Stem Cells and Their Role in Renal Ischemia Reperfusion Injury. *Am J Nephrol* 2013; 37:16–29.
22. Yao JK, Reddy R, McElhinny LG. Reduced status of plasma total antioxidant capacity. *Schizophr Res.* 1998; 32: 1-8.
23. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004; 37: 112-119.
24. Ghiselli A, Serafini M, Natella F. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29: 1106-1114.
25. Pulathan Z., Altun G., Hemşinli D., Menteşe A., Yuluğ E., Civelek A. Role of Ethyl Pyruvate in Systemic Inflammatory Response and Lung Injury in an Experimental Model of Ruptured Abdominal Aortic Aneurysm. *BioMed Research International.* 2014; 1-9.
26. Yener A.Ü., Çiçek M.C., Genç S.B., Özkan T., Doğan E., Bilgin B.Ç., Akin T., Erdem H., Ankarali H. Protective role of heparin in the injury of the liver and kidney on the experimental model of ischemia/reperfusion. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2014; 9:35-44.
27. Xiong J., Zhang M., Guo W., Liu X., Yin T., Jia X., Zhang H., Xu Y., Wang L. Early malperfusion, ischemia reperfusion injury, and respiratory failure in acute complicated type B aortic dissection after thoracic endovascular repair. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2013, 8:17-24.
28. Jaeschke H., Woolbright B.L. Current strategies to minimize hepatic ischemia–reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Transplant Rev (Orlando).* 2012; 26(2): 103–114.
29. Yokoyama H., Lingle D.M., Crestanello J.A., Kamelgard J., Kott B.R., Momeni R., Millili J., Mortensen S.A., Whitman G.J. Coenzyme Q10 protects coronary endothelial function from ischemia reperfusion injury via an antioxidant effect. *Surgery.* 1996; 120(2): 189-96.

30. Isik A.F., Kati I., Bayram I., Ozbek H. A new agent for treatment of acute respiratory distress syndrome: thymoquinone. An experimental study in a rat model. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2005; 28: 301–305.
31. Kurt E. Timokinon Uygulanan ratlarda Total Antioksidan Durumu (Tas) Ve Biyokimyasal Serum Profilinin Araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı (Veteriner Programı), Yüksek Lisans Tezi, 2013.
32. Bayrak O., Bavbek N., Karatas O.F., Bayrak R., Catal F., Cimentepe E., Akbas A., Yildirim E., Unal D., Akcay A. Nigella sativa protects against ischaemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Nephrol Dial Transplant* 2008 23: 2206–2212.
33. Ahmed M.A., Hassanein K.M.A. Cardio protective effects of Nigella sativa oil on lead induced cardio toxicity: Anti inflammatory and antioxidant mechanism. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 2013; 4(5): 72-80.
34. Khan A., Chen H., Tania M., Zhang D. Anticancer Activities Of Nigella Sativa (Black Cumin). *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011; 8(S): 226-232.
35. Acet E. Tıkanma Sarılığı Modelinde Glutamin ve Curcuminin Bakteriyel Translokasyon ve Oksidatif Hasar Üzerine Etkileri. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2009.
36. Gülçiçek O.B. Deneysel Tıkanma İkterinde Curcuminin Oksidatif Stres ve Hepatik Hasar İlişkisi. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Genel Cerrahi Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2008.
37. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=969516&loc=ec\\_rcs](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=969516&loc=ec_rcs)
38. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thymoquinone>
39. Zhang X., Chen., Wang Y., Peng W., Cai H. Effects of curcumin on ion channels and transporters. *Frontiers in Psysiology* 2014; 5(94): 1-6.
40. Shen S.Q., Zhang Y., Xiang J.J., Xiong C.L. Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J Gastroenterol* 2007; 13(13): 1953-1961.

41. Durna D. Metotreksat-İndüklü Gastrointestinal Hasara Karşı Silimarin'in Koruyucu Rolünün Araştırılması. Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2011.
42. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=53789646>
43. Shahbazi F., Khavidaki D.S., Khalili H., Pezeshki L.M. Potential Renoprotective Effects of Silymarin Against Nephrotoxic Drugs: A Review of Literature. *J Pharm Pharmaceut* 2012; 15(1) 112 – 123.
44. Ting H., Deep G., Agarwal R. Molecular Mechanisms of Silibinin-Mediated Cancer Chemoprevention with Major Emphasis on Prostate Cancer. *The AAPS Journal*, 2013; 15(3): 707-714.
45. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004; 37: 112-119.
46. Erol MK. Yoğun bakım hastalarında propofol, deksmedetomidin ve midazolam infüzyonlarının sedasyon, oksidan – antioksidan sistem üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi. Şanlıurfa 2011.
47. Dringen R. 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*; 62, 649-671.
48. Broznic, D., Marinic, J., Tota, M., Juresic, G.C., Milin, C. 2008. Kinetic evaluation of imidacloprid degradation in mice organs treated with olive oil polyphenols extract. *Croatia Chemica Acta*; 81, 203-209.
49. Staicu M.L., Mureşan A., Tache S., Moldovan R. 2011. Effects of exogenous antioxidants on oxidative stress in pregnancy. *Journal of Medicine and Life*; 4, 2, 163-167.
50. Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., Rezaie, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*; 10, 6, 141-147.
51. Schulz, J.B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J. 2000. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*; 267, 4904-4911.

52. Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 64, 178-189.
53. Robbins D., Zhao Y. 2011. The role of manganese superoxide dismutase in skin cancer. *Enzyme Research*; doi:10.4061/2011/409295.
54. Kelly S.A., Havrilla C.M., Brady T.C., Abroma K.H., Levin E.D. 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*; 106, 7, 375-384.
55. Adam-Vizi V., Starkov A.A. 2011. Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *Journal of Alzheimer's Disease*; 20, 2, 413-426.
56. Djordjevic V.B. 2004. Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology*; 237, 57-89.
57. El-Gendy K.S., Aly N.M., Mahmoud F.H., Kenawy A., El-Sebae A.H. 2010. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*; 48, 215-221.
58. Pandey S., Parvez S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez B., Raisuddin S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *The Science of the Total Environment*; 309, 105-115.
59. Park J.G., Oh G.T. 2011. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*; 44, 8, 497-505.
60. Cheung C.C.C., Siu W.H.L, Richardson B.J., De Luca-Abbott S.B., Lam P.K.S. 2004. Antioxidant responses to benzo[*a*]pyrene and Aroclor1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Environmental Pollution*; 128, 393-403.
61. Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G. 2010. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*; 61, 15, 4197-4220.



62. Sun Y. 1990. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*; 8, 583-599.
63. Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolin I., Herrera F., Martin V., Reiter R.J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*; 36, 1-9.
64. Espinoza S.E., Guo H., Fedarko N., DeZern A., Fried L.P., Xue Q, Leng S., Beamer B., Walston J.D. 2008. Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *Journal of Gerontology A: Biological Sciences and Medical Sciences*; 63, 5, 505-509.
65. Reid M., Jahoor F. 2001. Glutathione in disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*; 4, 65-71.
66. Sinha M., Manna P., Sil P.C. 2009. Induction of necrosis in cadmium-induced hepatic oxidative stress and its prevention by the prophylactic properties of taurine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*; 23, 300-313.
67. Kulinsky V.I., Kolesnichenko L.S. 2009. The glutathione system. II. Other enzymes, thiol–disulfide metabolism, inflammation, and immunity, functions. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*; 3, 3, 211- 220.
68. Bharath S., Hsu M., Kaur D., Rajagopalan S., Andersen J.K. 2002. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*; 64, 1037-1048.
69. Cnubben N.H.P., Rietjens I.M.C.M., Wortelboer H., Zanden J.V., Bladeren P.J.V. 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 10, 141-152.
70. Pastore A., Federicia G., Bertinib E., Piemonteb F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*; 333, 19-39.
71. Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*; 134, 489-492.

72. Camera E., Picardo M. 2002. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of Chromatography B*; 781, 181-206.

73. Camera E., Picardo M. 2002. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of Chromatography B*; 781, 181-206.

74. Yang Z.P., Morrow J., Wu A., Roberts L.J., Dettbarn W.D. 1996. Diisopropylphosphofluoridate-induced muscle hyperactivity associated with enhanced lipid peroxidation *in vivo*. *Biochemical Pharmacology*; 52, 357-361.

75. Sümbüloğlu K., Sümbüloğlu V. 2005. Biyoistatistik. Hatiboğlu yayınları, Ankara, sayfa 147 ve 154.

76. Mohamed A, Shoker A, Bendjelloul F, Mare A, Alzrigh M, Benghuzzi H, Desin T. Improvement of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by thymoquinone; an oxidative stress inhibitor. *Biomed Sci Instrum*. 2003;39:440-5.

77. Kalarıvanısailaja J, Manju V, Nalını N. Lipid profile in mice fed a high-fat diet after exogenous leptin administration. *Polish J Pharmacol*, 2003; 55: 763-769.

78. Hossainzadeh H., Taiari S., Nassiri-Asl M. Effect of thymoquinone, a constituent of *Nigella sativa* L., on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2012; 385:503-508.

79. Nemmar A., Al-Salam S., Zia S., Marzouqi F., Al-Dhaheri A., Subramaniyan D., Dhanasekaran S., Yasin J., Ali B.H., Kazzam E.E. Contrasting actions of diesel exhaust particles on the pulmonary and cardiovascular systems and the effects of thymoquinone. *British Journal of Pharmacology*. 2011;1871-1882.

80. Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol*. 2003; 26(2): 87-98.

81. Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany*. 2010; 76: 210-216.

82. El-Saleh SC, Al-Sagar OA, Al-Khalaf MI. Thymoquinone and Nigella sativa oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats *International Journal of Cardiology*. 2004; 93: 19-23.
83. Fouda, AMM, Daba, MHY, Dahab, GM, Sharaf El-Din, OA. Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008; 103: 109-118.
84. Gökçe A., Oktar S., Koc A., Gonenci R., Yalcinkaya F., Yonden Z., Duru M. Protective effect of thymoquinone in experimental testicular torsion. *Urol Int*. 2010; 85(4): 461-465.
85. Wang N.P., Wang Z.F., Tootle S., Philip T., Zhao Z.Q. Curcumin promotes cardiac repair and ameliorates cardiac dysfunction following myocardial infarction. *British Journal of Pharmacology*. 2012; 1550-1562.
86. Fan Z., Jing H., Yao J., Li Y., Hu X., Shao H., Shen G., Pan J., Luo F., Tian X. The Protective Effects of Curcumin on Experimental Acute Liver Lesion Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion through Inhibiting the Pathway of NF- $\kappa$ B in a rat Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014; 1-8.
87. Aydin M.S., Caliskan A., Kocarslan A., Yildiz S., Yildiz A., Günay S., Savik E., Hazar A., Yalcin F. Intraperitoneal curcumin decreased lung, renal and heart injury in abdominal aorta ischemia/reperfusion model in rat. *International Journal of Surgery*. 2014; 12(6); 601-605.
88. Sak M.E., Soydinc H.E., Sak S., Evsen M.S., Alabalik U., Akdemir F., Gul T. The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion injury in rat ovary. *Int J Surg*. 2013; 11(9): 967-970.
89. Onder A., Kapan M., Gümüş M., Yüksel H., Büyük A., Alp H., Başarili MK., Firat U. The protective effects of curcumin on intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusion injury. *Turk J Gastroenterol*. 2012; 23(2):141-147.
90. Altaei T. Protective effect of silymarin during coronary artery bypass grafting surgery. *Exp Clin Cardiol*. 2012; 17(1): 34-38.

91. Hou Y.C., Liou K.T., Chern C.M., Wang Y.H., Liao J.F., Chang S., Chou Y.H., Shen Y.C. Preventive effect of silymarin in cerebral ischemia-reperfusion-induced brain injury in rats possibly through impairing NF- $\kappa$ B and STAT-1 activation. *Phytomedicine*. 2010; 17(12): 963-973.

92. Aoyama, K., Watabe, M., Nakaki T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2008; 108, 227-238.

93. Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. *European Journal of Biochemistry*. 2000; 267, 4912-4916.

