

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GÖĞÜS KALP DAMAR CERRAHİSİ  
PERFÜZYONİSTLİK ANABİLİM DALI**

**SİLİMARİNİN VASKÜLER ENDOTEL  
HÜCRELERİNDE İSKEMİ REPERFÜZYON  
HASARININ ÖNLENMESİNDE ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SELDA ALAKUŞ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç.Dr. Mehmet Salih AYDIN**

**ŞANLIURFA  
2014**

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GÖĞÜS KALP DAMAR CERRAHİSİ  
PERFÜZYONİSTLİK ANABİLİM DALI

**SİLİMARİNİN VASKÜLER ENDOTEL  
HÜCRELERİNDE İSKEMİ REPERFÜZYON  
HASARININ ÖNLENMESİNDE ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELDA ALAKUŞ

DANIŞMAN

Yrd. Doç.Dr. Mehmet Salih AYDIN

Bu tez, Hr.Ü Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 13159 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA  
2014

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ

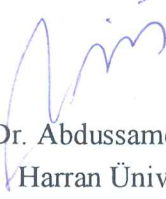
## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Selda ALAKUŞ'UN hazırladığı "Silimarinin vasküler endotel hücrelerinde iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde etkinliğinin araştırılması" konulu çalışma .../.../2014 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek

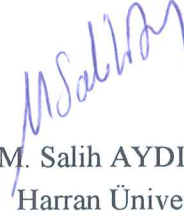
Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalında Perfüzyonist Yetiştirme Programı **YÜKSEKLİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Mustafa GÖZ  
Harran Üniversitesi  
BAŞKAN



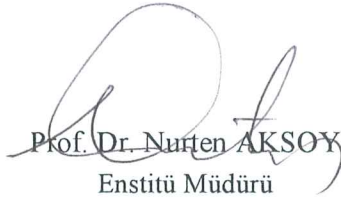
Doç. Dr. Abdussamed HAZAR  
Harran Üniversitesi  
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. M. Salih AYDIN(Danışman)  
Harran Üniversitesi  
ÜYE

ONAY

30 1121 2014



Prof. Dr. Nuriye AKSOY  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tezimin planlanması ve sürdürülmesinde tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalandığım, benden her türlü ilgisini, yardımını esirgemeyen, sabır ve titizlikle yanımda olan bölüm başkanımız Sayın Doç. Dr. Mustafa GÖZ'e ,danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Salih AYDIN' a , hiçbir desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr.Abdussemed HAZAR'a, deney ve laboratuvar çalışmalarımızda yardımları sebebiyle Sayın Yrd. Doç. Dr. Aydemir KOÇARSLAN'a, çalışmamızın biyokimyasal çalışmasını yapan Harran Üniversitesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı çalışanları, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve aynı zamanda Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü olan sayın Prof. Dr. Nurten AKSOY'a ve eğitim hayatım boyunca her türlü desteği veren aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Selda ALAKUŞ

28.08.2014

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarı (İRH)	4
2.1.1. Serbest radikaller	5
2.1.2.Polimorf nüveli lökositler (PMNL)	6
2.1.3.Komplemanın rolü	9
2.1.4.Endotel hücrelerinin rolü	9
2.2.Antioksidanlar	10
2.2.1. Endojen Antioksidanlar	12
2.2.2. Eksojen Antioksidanlar	15
2.3. Silimarin	17
2.3.1. Silimarinin Botanik Özellikleri ve Kimyasal Bileşimi	18
2.3.2. Silimarin'in Genel Etki Mekanizması	20
2.3.3. Silimarinin Antioksidan Etki Mekanizması	21
2.3.4. Kardiyopulmoner Sistem Üzerinde Etki Mekanizması	22
2.3.5. Silybum marianum (L.) Gaertner Literatüre Dayalı Kullanımı.	23
2.4. Aort Cerrahisinde İskemi Reperfüzyon Hasarı	23
2.5. Total Antioksidan Seviye (TAS)	24
2.6. Total Oksidatif Stres (TOS)	25
2.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1 Çalışma gruplarının oluşturulması	26
3.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı Modeli	26
3.3. Tedavi Edici Ajanların Hazırlanması	27
3.4. Deney Grupları ve Protokol	27
3.5.Vasküler Endotel Yapının Histopatolojik İncelenmesi	28

3.6. TAS Ölçümü	28
3.7. TOS Ölçümü	28
3.8. OSİ Hesaplanması	29
3.9. İstatistiksel Analiz	29
4.BULGULAR	30
4.1. Grupların TAS Değerlerinin Karşılaştırılması	30
4.2. Grupların TOS Değerlerinin Karşılaştırılması	32
4.3. Grupların OSİ Değerlerinin Karşılaştırılması	33
4.4. Grupların Histopatolojik Hasar Skorlarının Karşılaştırılması	34
5.TARTIŞMA	35
6.SONUÇ	37
7.KAYNAKLAR	38

## **GRAFİK DİZİNİ**

Sayfa No

**Grafik 4.1.** Gruplar arası TAS değerlerinin karşılaştırılması

**35**

**Grafik4.2.** Gruplar arası TOS değerlerinin karşılaştırılması

**36**

**Grafik 4.3.** Gruplar arası OSI değerlerinin karşılaştırılması

**38**



## **ŞEKİL DİZİNİ**

Sayfa No

**Şekil- 2.1.** İskemi reperfüzyonda hasarında yer alan olaylar dizisi

**12**

**Şekil-2.2.** Silimarinin kimyasal formülü

**21**





## **TABLO DİZİNİ**

Sayfa No

**Tablo-4.1** Gruplar Arası, TAS, TOS, OSİ Karşılaştırılması

**33**



## RESİM DİZİNİ

Sayfa No

**Resim 1.** Mikrovasküler klemp ile sıçan aortu oklüzyonunun vasküler endotel hasarı oluşturma etkisinin incelenmesi

**39**



## KISALTMALAR

<b>AAA</b>	:Abdominal Aortik Anevrizma
<b>AMP</b>	:Adenozin mono fosfat
<b>ATP</b>	:Adenozin Tri Fosfat
<b>Ca</b>	:Kalsiyum
<b>CAT</b>	:Katalaz
<b>CCL4</b>	:Karbon tetraklorür
<b>DMSO</b>	:Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	:Deoksiribonükleik asit
<b>ET</b>	:Endotel
<b>EtOH</b>	:Etanol
<b>Fe</b>	:Demir
<b>GSH</b>	:Glutatyon
<b>GSH-Px</b>	:Glutatyon Peroksidaz
<b>GSH-R</b>	:Glutatyon redüktaz
<b>GST</b>	:Glutatyon S-Transferaz
<b>HDL</b>	:Yüksek Dansiteli Lipoprotein
<b>HOO</b>	:Hidroksilik radikal
<b>HOCl</b>	:Hipoklorid
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	:Hidrojen peroksit
<b>KAT</b>	:Katalaz
<b>KDH</b>	:Ksantin dehidrojenaz-
<b>KO</b>	:Ksantin oksidaz-
<b>İ/R</b>	:İskemi-reperfüzyon-
<b>İRH</b>	:İskemi reperfüzyon hasarı-
<b>İAA</b>	:İnfrarenal Abdominal Aorta-
<b>ICAM-1</b>	:İnterelüler Adhezyon Molekülü 1-
<b>IL</b>	:İnterlökin
<b>İP</b>	:Periton içi (intra peritoneal)
<b>İRH</b>	:İskemi Reperfüzyon Hasarı

<b>K<sup>+</sup></b>	:Potasyum
<b>KDH</b>	:Ksantin Dehidrojenazın
<b>KO</b>	:Ksantin Oksidaza
<b>LOOH</b>	:Lipid hidroperoksit-
<b>LT</b>	:Lökotrienler
<b>LT-B4</b>	:Lökotrien B4
<b>MCP</b>	:Monosit Kemoatraktan Protein
<b>MMP-2</b>	:Matrix metallopeptidase-2
<b>MOF</b>	:Çoklu Organ Yetmezliği
<b>MT6</b>	:6-sulfatoksimelatonin
<b>Na</b>	:Sodyum
<b>NAD</b>	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>NADPH</b>	:Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
<b>NF-Kb</b>	:Nükleer transkripsiyon faktör
<b>NO</b>	:Nitrik oksit
<b>NO<sub>3</sub></b>	:Nitrat
<b>NOS</b>	:Nitrik oksit sentaz
<b>OH</b>	:Hidroksil
<b>6-OHDA</b>	:6-hidroksidopamin
<b>PAF</b>	:Trombosit Aktive Edici Faktör
<b>PECAM</b>	:Adhezyon Molekülü
<b>PG</b>	:Prostaglandin
<b>PMNL</b>	:Polimorf Nüveli Lökositler
<b>PSGL -1</b>	:P- Selektin Glikoprotein 1
<b>RAAA</b>	:Rüptüre Abdominal Aortik Anevrizmaları
<b>RNA</b>	:Ribonükleikasit
<b>ROOH</b>	:Hidroperoksit
<b>SH</b>	:Sülhidril
<b>SIRS</b>	:Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu
<b>SNC</b>	:Substantia nigra parscompacta
<b>SOD</b>	:Süperoksit Dismutaz
<b>SOR</b>	:Serbest Oksijen Radikal

<b>TAAA</b>	:Torakoabdominal Aortik Anevrizma
<b>TAS</b>	:Total Antioksidan Seviye
<b>TIMP-2</b>	:Metalloproteinaz-2
<b>TNF</b>	:Tümör Nekrozis Faktör
<b>TBARS</b>	:Tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri
<b>TxA2</b>	:Tromboksan A2
<b>TOS</b>	:Total Oksidatif Stres
<b>u-PA</b>	:Urokinaz plazminojen aktivatör
<b>O<sub>2</sub></b>	:Oksijen
<b>OSİ</b>	:Oksidatif Stres İndeksi
<b>VCAM</b>	:Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü
<b>WHO</b>	:Dünya Sağlık Örgütü

## ÖZET

### Silimarinin Vasküler Endotel Hücrelerinde İskemi-Reperfüzyon Hasarının Önlenmesinde Etkinliğinin Araştırılması

Selda ALAKUŞ

Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Perfüzyonist Yüksek Lisans Tezi

**Giriş:** Silimarinin iskemi reperfüzyona karşı koruyucu etkisi çeşitli organlarda gösterilmiştir. Biz Silimarinin abdominal aortada iskemi reperfüzyon injürisinde vasküler doku üzerine olası etkisi araştırılmasını amaçladık.

**Materyal ve Metod:** Onbeş sıçan sham (n:5), kontrol(n:5) ve Silimarin tedavi grubu(n:5) olarak üçe ayrıldı. Kontrol ve tedavi grubuna 60 dakika abdominal aort iskemi sonrası 120 dakika reperfüzyon uygulandı. Tedavi grubunda silimarin reperfüzyondan 5 dakika önce 200 mg/kg intraperitoneal verildi. Kan serumunda Total antioksidan kapasite (TAS), Total oksidatif stres (TOS), Oksidatif stres indexi (OSI) ölçüldü, aort dokusu histopatolojik olarak ışık mikroskopunda incelendi.

**Bulgular:** TOS ve OSI aktivitesi sham ve tedavi grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük idi ( $p < 0.001$  for TOS and OSI). Kontrol grubuna göre tedavi grubu hasar skoru eşit idi.

**Sonuç:** Akut abdominal aort iskemi reperfüzyon sıçan modelinde silimarinin intraperitoneal verilmesi oksidatif stresin azalmasında etkilidir fakat aort dokusu iskemi reperfüzyondan etkilenmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Oksidatif stres, İskemi/Reperfüzyon Hasarı, Silimarin

## ABSTRACT

### **Researching the effectiveness of Sliymarin for preventing the ischemia-reperfusion injury in vascular endothelial cells**

**Selda ALAKUŞ**

Thoracic and Cardiovascular Surgery Department, Perfusionist Master's Degree Thesis.

**Introduction:** Sliymarin has protective effects against ischemia reperfusion injury to various organs in different experimental models. We aimed to determine whether Sliymarin has favorable effects on vascular tissues and oxidative stress in abdominal aorta ischemia- reperfusion injury.

**Material and method:** Fifteen rats were divided into three groups as sham (n:5), control (n:5) and Sliymarin treatment group (n:5). The control and treatment groups underwent abdominal aorta ischemia for 60 min followed by a 120 min period of reperfusion. In the treatment group, Sliymarin was given 5 min. Before reperfusion at a dose of 200 mg/kg intraperitoneally. Total antioxidant capacity (TAC), total oxidative status (TOS) and oxidative stres index (OSI) in blood serum were measured, and aort tissue histopathology were evaluated with light microscopy.

**Results:** TOS and OSI activity in blood samples were statistically increased in the control group compared to the sham and treatment groups ( $p < 0.001$  both). The control group injury scores were statistically equal compared to sham and Sliymarin treatment groups.

**Conclusions:** Sliymarin administered intraperitoneally was effective in reducing oxidative stres in an acute abdominal aorta I/R rat model but histopathologically aort was not affected in injury.

**Keywords:** Oxidative stress, Ischemia/ Reperfusion Injury, Silymarin

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Arteriyel ya da venöz kan akımının azalmasına bağlı yetersiz perfüzyon sonucu, doku veya organların oksijen (O<sub>2</sub>)'den yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku hasarı oluşturarak hücre ölümüne yol açmaktadır. Geri dönüşümsüz hücre hasarının önlenmesi için dokuya kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) gerekmektedir. Ancak iskemik dokularda gerçekleşen reperfüzyon, iskeminin dokuda oluşturduğundan daha fazla hasara yol açmaktadır (1).

Abdominal aortun klemplenmesi klempl distalinde iskemi oluştururken, aortik kros-klemplin kaldırılması sonrası dolaşımın ani olarak yeniden sağlanması reperfüzyon hasarını başlatır ve bu fenomen iskemi-reperfüzyon (İR) hasarı olarak tanımlanır (2).

İR sonucu meydana gelen kimyasal olaylardan oluşan serbest oksijen radikallerin Zaralı etkileri ,süpürücü etkisi olan antioksidanlar tarafından zayıflatılır yada ortadan kaldırılır. antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir (3). Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipitlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucunda antioksidanlar başta lipit peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise antioksidanların tanımı lipitlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir (4,5). Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta “antioksidan savunma sistemleri veya antioksidanlar” adı verilen birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bütün hücreler, güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı savaşmaktadırlar. Savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi ve serbest radikal tutucuları etkili olmaktadır. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. Bu hasarlar genel olarak şöyle sıralanabilir:

- Hücre membran bütünlüğünün bozulması
- Membran lipit ve proteinlerinin denatürasyonu



-Nükleik asitlerin (DNA/RNA) mutasyonu

-İmmün sistemin supresyonu

Organizmada oksidan ürünlere karşı savunma ise üç şekilde gerçekleşmektedir (6);

1-Serbest radikal reaksiyonlarının sonlandırılması

2-Serbest radikal reaksiyonlarının sınırlandırılması

3-Oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonu

Antioksidanların başlıca etki mekanizmaları dört şekilde gerçekleşir bunlar:

Süpürücü etki, inaktif şekle dönüştürücü etki, onarıcı etki ve zincir kırıcı etkisidir.

Silybum marianum L. Gaertn. (devedikeni), Asteraceae familyasına ait bir bitki olan silimarin kuvvetli bir antioksidandır. S. marianum L. tohumları, karaciğer ve safra kesesi hastalıkları ile toksin zehirlenmelerine karşı karaciğeri korumada; aynı zamanda mantar zehirlenmeleri, yılan sokması, böcek ısırıkları gibi durumların tedavisinde de 2000 yıldan beri kullanılmaktadır. S. marianum L. tohumlarından elde edilen ekstraktları bol miktarda silimarin içermektedir. Kimyasal olarak silimarin; silibin (silibinin), izosilibin, silikristin, silidianin ve dehidrosilibinin adı verilen izomer avanolignanlardan oluşmaktadır (7). Silimarinin biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülen temel bileşeni silibin'dir ancak yapısında bulunan diğer avano-lignanların da bu biyolojik aktivitede rolü olabileceği düşünülmektedir (8). Fakat silimarinin asıl aktivitesi; içerdiği avano-lignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile antioksidan özellik göstermesi ve buna bağlı olarak serbest radikal tutucu işlevinin bulunmasıdır (9). Silimarinin hücre GSH seviyesinde artışa neden olduğu (10), SOD aktivitesini arttırdığı (11) ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini (12) ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışmamızda amacımız aort cerrahisinde kullanılan kros-kelep tekniğine bağlı olarak gelişen iskemi reperfüzyon hasarında silimarinin vasküler endotel hücrelerinde antioksidan özelliğinin etkinliğini TAS, TOS, OSI parametreleriyle ve histopatolojik olarak araştırmaktır.

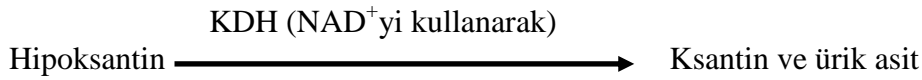
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.İskemi Reperfüzyon Hasarı

Arteriyel veya venöz kan akımının yetersiz kalmasına bağlı doku ve organların yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne neden olmaktadır(13). Hücre fonksiyonunda temel gereksinim oksijendir. İskemi sonucu dokulara yeterli oksijen sağlanamaması hücre disfonksiyonuna ve sonuçta hücre ölümüne neden olan bir dizi kimyasal olayı başlatır. Oluşan bu anaerobik metabolizmayla laktik asit artışının yarattığı asidoz normal enzim kinetiğini değiştirerek yüksek enerjili bağların azalmasına ve hücre dengesinin korunması için gereken enerjinin yetersiz kalmasına sebep olur (14,15). İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (13). Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücrel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir(16). İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelmesiyle birlikte dokuya gelen kan akımının kesilmesi ile hücrel oksidatif fosforilasyon azalır ve adenosin 5-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır (17). Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında olan  $Na^+$ ,  $K^+$ , ATP az pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde  $Na^+$  ve  $Ca^{+2}$  iyon yoğunluğu artar (18).  $Ca^{+2}$  iyon yoğunluğunun hücre içindeki artışı hücre için sitotoksik etki yaratır(19). Nitekim yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflamatuvar sitokinlerin lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma olur. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar. İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den AMP ve adenosin oluşur. Adenosin, hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili

fosfat bileşiklerinin (ATP) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı  $NAD^+$  (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle  $KDH \rightarrow KO$ 'a dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır (20).

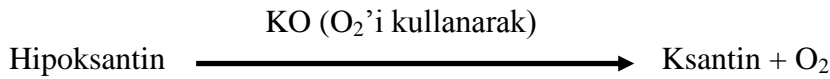
Normal şartlarda:



İskemide:



Reperfüzyon ile:



İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunların birbiriyle ilişkileri hücresele, karmaşık ve humoral olaylar serisidir (21,22).

Özellikle;

1-Serbest oksijen radikalleri

2-Polimorf nüveli lökositler (PMNL)

3-Kompleman sistemi

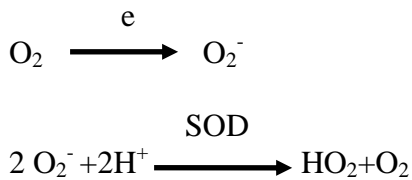
4-Endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır.

### 2.1.1.Serbest Radikaller

Serbest (free) radikal, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunan bir atom veya moleküldür. Hem organik hem de inorganik moleküller halinde bulunurlar (23,24). Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle stabildirler ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir (25).

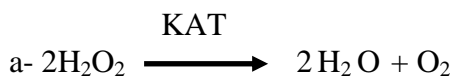
Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen radikalleri sayısız enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidirler. Ancak, her bir radikalın yapısı ve etkili olduğu yere göre hücrel hedefler risk altındadır (26, 27, 28). Aerobik organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için oksijenin gerekliliği kaçınılmazdır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron trans transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5 'i de son yörüngelerinde ortaklanmış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir. İnsanda her yıl 2 kg O<sub>2</sub> oluştuğu bildirilmiştir(29).

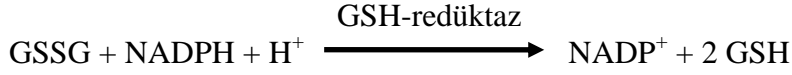
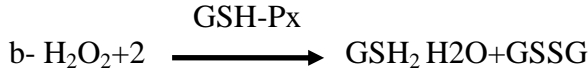
Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir(30).



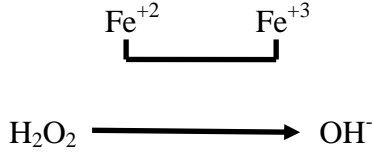
Hidrojen peroksitin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir.

1- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalaz (KAT) veya glutatyon peroksidaz (GSHPx) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür:





2-  $\text{H}_2\text{O}_2$  geçiş metallere varlığında toksik OH radikaline dönüşür: Fenton reaksiyonu.



Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir; ilk karşılaştığı molekül ile 10-6 s içinde, 14 Å mesafesinde reaksiyona girer. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Makro moleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir. İn vivo herhangi bir OH<sup>-</sup> radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle OH radikalinin oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir (31).

### 2.1.2. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir(32). İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir(33). Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (34). Bunlar:

- 1- Mikrovasküler oklüzyon;
- 2- SOR salınması;
- 3- Sitotoksik enzim salınması;
- 4- Vasküler permeabilite artışı;

##### 5- Sitokin salınmasında artıştır.

Polimorf nüveli lökositlerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur. Selektinler olarak bilinen adhezyon moleküllerinin L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İ/R, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu arttırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur (lökosit rolling). İkinci aşamada, lökosit beta2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasındaki etkileşim sonucunda lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşama ile, trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktive lökositler damar dışına ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis) (35).

Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1 (IL-1), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandin (PG) türleri vardır. Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-kB) aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör (TNF-a) sentezine yol açar(33). Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu maddeler, mast hücrelerinden selektin ve ICAM gibi adhezyon moleküllerini mobilize eden inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını uyarırlar. Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar (35). Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin gelişmesi, normalde immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir (36) Hücresel ölüm yolağındaki düzensizlikler, iskemi-reperfüzyon hasarının yanı sıra, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da yol açabilmektedir.

Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir (37,38):

1- Fosfolipaz A2 aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostoglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir.

2-Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır.

3-SOR üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü araçlarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşım yoluyla ortamdan uzaklaştırılırlar (13,37).

İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, post-kapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda O<sub>2</sub> oluşurken NO oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF-a gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur (38,39).

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz enzimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması ile SOR'un salınması "solunum patlaması" olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksit'e dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik moleküle kolayca reaksiyona girebilir. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salınan apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır(40).

### 2.1.3.Komplemanın Rolü

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proinflamatuvar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)- 1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır (41):

- 1- Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1)
- 2-İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1)
- 3-E-selektin
- 4-P-selektin

C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (42, 43).

### 2.1.4.Endotel Hücresinin Rolü

İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretir. NO arteriyel dolaşımında ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin/ NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur (44).

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I2, PG E2), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A2 (TxA2) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını



sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir(38). Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipid radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO<sub>3</sub>) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler (45).

## 2.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu önleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini önleyen ve genellikle yapısında fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir (46). Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara oranla daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede önler ya da geciktirirler. Prooksidanlar (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) ise, lipidler, nükleik asitler ve proteinlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ya da hastalıklara neden olan toksik maddelerdir. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır(47). Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir (48).

Organizmanın pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmesi için çok önemlidir. Serbest oksijen radikallerin oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan “antioksidan savunma sistemi” dört yolla etki göstermektedir:

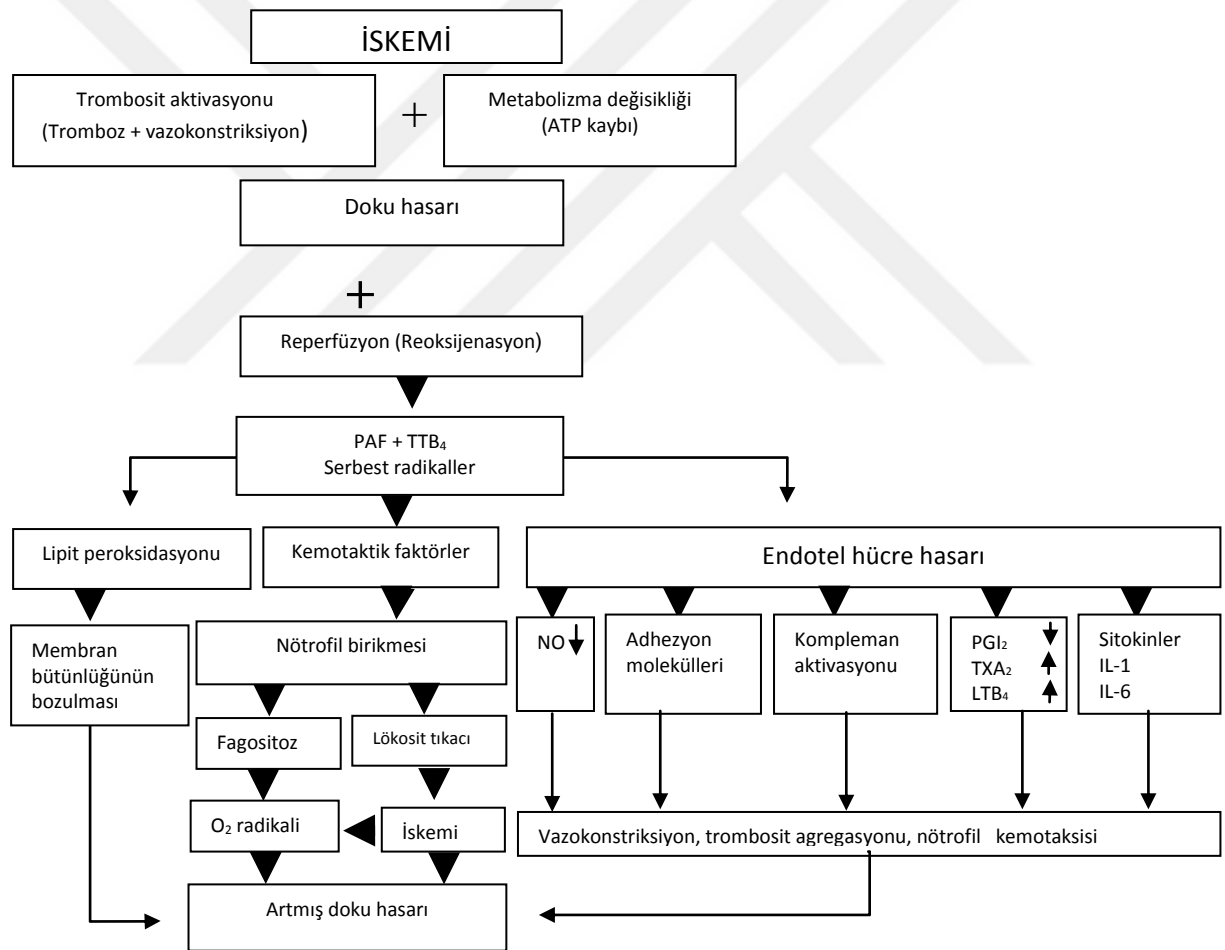
1-Süpürücü etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, etkisi olan süpürücü etkisidir. Antioksidan enzimler, bu yolla etki gösterirler (49,50).

2-İnaktif şekle dönüştürücü etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürücü etkisidir. Flavanoidler ve vitaminler bu şekilde etki ederler (51).

3-Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını önleyici etkisi zincir kırıcı etkidir. Hemogloblin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı şekilde etki gösterirler(52).

4- Onarıcı etki: Serbest radikallerin meydana getirdikleri hasarın onarılması şeklinde “onarıcı etki” gösterirler (53).

Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olan antioksidanların tanımlanmasında ve etkinliklerinin ortaya konmasında İ/R (iskemi reperfüzyon ) hasarı modelleri önemli katkı sağlamıştır.

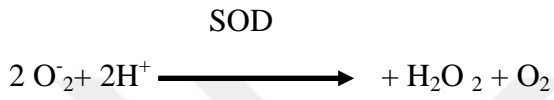


Şekil 2.1. İskemi reperfüzyonda hasarında yer alan olaylar dizisi (54).

### 2.2.1. Endojen Antioksidanlar

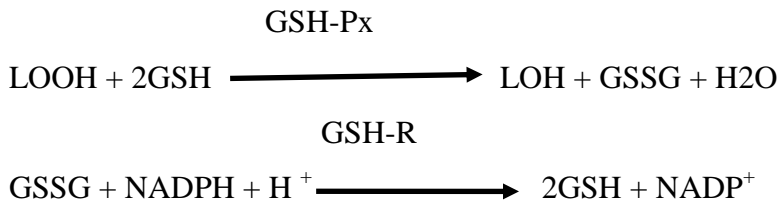
Enzim ve enzim olmayanlar olarak ikiye ayrılır. Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSHPx), Glutasyon S-Transferaz (GST), Katalaz, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve Hidroperoksidaz enzim olan antioksidandır(55).

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalini ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimidir.



Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda  $O_2$  üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafında düşük tutulur. Ancak,  $H_2O_2$  geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile son derece aktif OH radikaline dönüşmektedir. Bu durumda CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesi artarak  $H_2O_2$  düzeylerini kontrol altına almaktadır (56).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon redüktaz (GSH-R) Gerek  $H_2O_2$  ve gerekse LOOH'leri metabolize etmektedir. Selenyum-bağımlı ve selenyum-bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum-bağımlı tipi  $H_2O_2$  ve LOOH'leri, selenyum- bağımsız tipi sadece LOOH'leri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından  $H_2O_2$  ve LOOH indirgenirken GSH ise okside şekline (GSSG) dönüşür. Okside glutasyon ise NADPH bağımlı glutasyon redüktaz (GSH-R) tarafından tekrar GSH'a indirgenir.



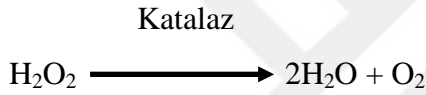
GSH-Px'in fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal etkisi ile fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır.37

Eritrosit GSH-Px aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelde düşük bulunmuştur. Lökosit GSH-Px aktivitesi ise yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur (57).

Glutasyon S-transferaz dimerik yapıda olup sitozolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder (57).



Katalaz esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur.  $H_2O_2$ 'yi oksijen ve suya parçalar. Böylece  $H_2O_2$ 'nin OH oluşumunu önlemek için ortadan kalkmasını sağlar (56).



Glutasyon, Melatonin, Seruloplazmin, Transferin, Miyoglobin, Hemoglobin, Ferritin, Bilirubin, , Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin ve Albümin enzim olmayan antioksidanlardır (56).

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki de en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde  $\gamma$ -glutamil sistein sentaz ve GSHsentaz enzimleri katalizördür.

Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir(57).

GSH homeostazı için diyetle yeterli protein alınmasının gerekli olduğu ve enteral veya parenteral alınan sistin, metiyonin ve N-asetilsistein'in GSH biyosentezinde sisteinin prekürsörü olarak önemli rol oynadığı çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Yaşamsal fonksiyonlarda öneme sahip GSH'nın hayvan çalışmalarında yeterli konsantrasyonlarda

lenfositlerin ve ince barsak epitel hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğu belirtilmiştir. Spermatojenez ve sperm olgunlaşmasında önemli rol oynadığı, influenza enfeksiyonunu inhibe ettiği, T-lenfositlerin, PMNL'lerin ve sitokinlerin aktivasyonu için gerekli olduğu ve immün sistemin önemli bir elemanı olarak fonksiyon gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalar GSH eksikliğinin oksidatif strese yol açtığını ve Alzheimer, Parkinson, epilepsi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, AIDS, kanser, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi pek çok hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymaktadır (58).

Melatonin ilk olarak 1958'de hipofizin anatomik ve fizyolojik rolünün araştırılmasından sonra izole edilmiştir. Melatonin sirkadiyan ritim, uyku düzenlenmesi, hücre büyümesi, immün fonksiyon, hücre büyümesi ve diğer endokrin düzenlemelerle ilişkili olduğu bulunmuştur (59).

Melatonin, memelilerde başta pineal bez olmak üzere over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur. Sentezinin düzenlenmesi primer olarak geceye, diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır(49). Endojen melatonin gece 21:00 civarında salınmaya baslar ve 2:00 ile 4:00 arasında pik yapar. Melatonin salınımı tipik olarak 7:00 ve 9:00 arasında inhibe olur ve endojen kortizolün pikiyle denk gelir. Ortalama plazma melatonin konsantrasyonları 60–70 pg/mL arasındadır (60). Dalgalanan melatonin konsantrasyonları sadece epifiz kaynaklıdır (61). Melatoninin ana metaboliti 6-sulfatoksimeleatoninidir (MT6) melatoninin plazma konsantrasyonları idrar MT6 konsantrasyonlarıyla uyumludur. Tipik MT6 atılım paterni gece yarısından sonra pik yapar ve kişisel farklılıklarla akşam üzeri en alt düzeydedir. Endojen melatoninin ritmik salınımından sempatik innervasyon sorumludur, melatonin salınımı norepinefrinle B1 ve B2 reseptörleriyle stimüle edilir. Serotoninin reseptör-modüle edici etkisi vardır ama özel rolü hala net değildir (60). Melatonin dokulara ve hücrelere kolaylıkla girebilmektedir. Oral uygulamada ilk geçiş etkisine maruz kalır. Melatonin esas olarak karaciğerde metabolize edilir ve idrar ile atılır. Melatonin özellikle Amerika'da ilaç olarak bulunabilen ve en çok 'jetlag' için kullanılan bir maddedir. Bununla beraber, melatoninin kanseri önleyici etkileri, hücresel hasarın onarımındaki rolü ve bağışıklık sistemini destekleyici etkileri olduğu da gösterilmiştir (49).

Melatonin lipit çözünürlüğünün yüksek olması nedeniyle hücrelere rahatça girebilmektedir. Son çalışmalar melatoninin hücre çekirdeğinde yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve melatonin için spesifik bağlanma noktalarının olduğunu göstermiştir. Melatonin güçlü bir radikal süpürücüsü olduğu gibi, radikaller üzerinde dolaylı etkilere de

sahiptir. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O<sub>2</sub> radikalini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir. Oksidatif hasarın rol oynadığı İ/R dahil pek çok deneysel modelde (yanık hasarı, ülser, ve ilaç toksisiteleri, tümör oluşumu gibi) melatoninin olumlu etkileri gösterilmiştir. Yaşlanma ile birlikte melatonin üretiminin azalması yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneğinde artan oksidan hasarın ve melatonin yetersizliğinin önemli rolü olduğunu göstermektedir (62, 63)

Pürin metabolizmasında son ürün olarak oluşan ürik asit, insan dokularında ürat oksidaz bulunmadığı için birikir. Ürik asit singlet O<sub>2</sub>, peroksil radikalleri, ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve endojen bir antioksidan olarak kabul edilir (64).

### **2.2.2. Eksojen Antioksidanlar**

Vitamin eksojen antioksidanlar: a-tokoferol (vitamin E), β-karoten, Askorbik asit (vitamin C), Folik asittir (folat).

Vitamin E ilk kez Evans ve Bishop tarafından 1972 yılında bulunmuştur. Yağda eriyen ve esansiyel bir vitamindir. Vitamin E, alfa, beta, gamma ve delta tokoferoller ile tokotrienollerden oluşan 8 ayrı maddenin grup adıdır. Alfa tokoferol en yüksek biyolojik aktivitesi olan vitamin E bileşimidir (55, 66, 67).

Vitamin E yağda eriyen çok güçlü bir antioksidandır, hücre zarı fosfolipitlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonu, vitamin E'nin zincir kırıcı etkisiyle sonlandırılabilir. Oluşturduğu bu koruyucu reaksiyonlar sırasında kendisi radikal formuna dönüşse de, askorbik asit, glutatyon ve koenzim Q10 (ubikinon) tarafından tekrar aktif haline döndürülür. Vitamin E, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar; selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır. Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve vitamin E ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği gösterilmiştir (68).

Vitamin C (askorbik asit) suda çözünen en güçlü antioksidan molekülüdür. İnsanlarda sentez edilmediğinden diyetle alınması gerekir. Organizmada kolayca dehidroaskorbik aside oksitlenebilir.  $O_2^-$ ,  $HO^-$ , singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. C vitamini kornea, lens, aköz hümör, adrenal, hipofiz, beyin, kalp, karaciğer, dalak, böbrek ve pankreasta yüksek miktarda bulunur. Yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgiller önemli C vitamini kaynaklarıdır. C vitamini antioksidan etkisi yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali ( $OH\bullet$ ) oluşturmaya uygun ferröz demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir. Vitamin C'nin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir (69).



Bu şekilde oluşan C vitamini radikali çok reaktif değildir, NADH tarafından indirgenir, ya da iki proton alarak serbest radikal reaksiyonlarını durdurur.

Karotenoid pigmentler(B-Karoten); metil grupları bağlanmış alifatik bir konjuge çift bağ sisteminden oluşmaktadır. Diğer bir deyişle yapı, birbirine kovalent olarak bağlanmış izo büten birimlerinden oluşmaktadır. Yapılarına göre "hidrokarbon karotenoidler" ve "ksantofiller" olarak da adlandırılan apolar özellikteki hidrokarbon karotenoidlerin başlıcaları:  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten ve likopendir (70).

Vitamin A'nın ön maddesi olan  $\beta$ -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve OH, alkoksil ve peroksil radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü ve lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebildiği saptanmıştır. Singlet  $O_2$  uzaklaştırıcı olarak bilinen en güçlü karotenoid likopendir (64).

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar ise(64):

- 1-Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- 2-NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar)
- 3-Rekombinant süperoksit dismutaz trolox-C (vitamin E analogu),

- 4-Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- 5-Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- 6-Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- 7-Nötrofil adezyon inhibitörleri
- 8-Sitokinler (TNF ve IL-1)
- 9-Barbitüratlar
- 10-Demir şelatörleridir.

### 2.3.Silimarin

*Silybum marianum* (L.) Gaertner bitkisinin gövdesi 30-100 cm yükseklikte, Papatyagiller (Asteraceae) familyasına bağlı otsu bir bitkidir. Bitki doğal olarak Akdeniz bölgesinde yetişmekte, aynı zamanda yaygın bir şekilde Avrupa kıtasının birçok kesiminde, Kuzey ve Güney Amerika ve yabani olarak Avustralya’da yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Ülkemizin ise batı, kuzey ve güney bölgelerinde yaygındır. Yol ve tarla kenarları ile boş tarlalarda yetişmektedir. Bitkinin geniş dikenli yaprakları üzerinde, süte benzeyen iri beyaz lekeler bulunur, bu nedenle İngilizce’de “süt dikenini” anlamında “Milk thistle” olarak adlandırılır (71, 72, 73, 74).

Bir inanışa göre Hz. İsa’yı emziren Hz. Meryem’in sütü, bitkinin yaprağına damlamış ve bitkideki beyaz lekeler ile damarlar oluşmuştur. Bu nedenle bitki “Meryem dikenini” olarak da anılır (71).

*Silybum marianum* (L.) Gaertner İngilizce olarak “Milk thistle”, Latince olarak, “*Carduus marianus* L.”, “*Silybi mariae fructus*”, “*Cardui mariae fructus*”, Almanca olarak “*Meriendistelfüchte*”, “*Marienkörner*”, Fransızca olarak “*Chardon Marie*”, İtalyanca olarak “*Carduo Mariano*” ve Danimarkaca olarak “*Marietidsel*” olarak bilinmektedir. Yaygın olarak “*Marian thistle*, *wild artichoke*, *variegated thistle*, *St. Mary’s thistle*, *Christ’s crown*, *holy thistle*, *Venus thistle*, *heal thistle*, *wand of God’s grace*” isimleriyle de bilinmektedir(72,75).

Türkiye’de ise Akkız, devedikenini, deve kengeri, kengel, kıbbun, Meryemana dikenini, sütlü kengel, şevkülmeryem, uslu kenger” isimleri ile bilinmektedir (72,73).

*Silybum marianum* (L.) Gaertner bitkisinin kullanışı yaklaşık 2000 yıl öncesine kadar dayanır. MS 1. yüzyılda Anadolu’da yaşamış olan hekim Dioscorides bitkinin köklerini



kusturucu olarak önermiş, yapraklarını haşlayarak hazırladığı dekoksionları yılan sokmasında kullanmıştır. Bitkinin kullanışları Almanya'da 19. yüzyılın ortalarında canlanırken 1930 yılında modern uygulamalarda yeniden kullanılmaya başlanmıştır (71,75). Eskiden beri bitkinin meyveleri kolagog, dispepsi, iştah açıcı olarak, sarılık ve mide rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmıştır. 1597 yılında herbalist Gerarde; melankoli (karaciğer ile ilgili) hastalığı için *Silybum marianum* (L.) Gaertner bitkisi iyi bir tedavi ajanı olduğunu söylemiştir. 1650 yılında Culpeper bitkinin dalak ve karaciğerin obstrüksiyonunu engelleyebildiğini yazmıştır. 1755 yılında ise Von Haller bitkiyi çeşitli karaciğer rahatsızlıklarında kullandığına dair kayda almıştır. Avrupa'lı hekimler bitkiyi *Materia Medica* kayıtlarına almışlardır (75).

*Silybum marianum* (L.) Gaertner meyvelerinden elde edilen aktif bileşik flavonolignan karışımı olan silimarin'dir. Bu karışım silidiyanin, silikristin ve major olan silibinin adlı bileşenlerden oluşmaktadır(75). Klinik çalışmalar, silimarin'in karaciğeri alkol, asetaminofen, karbon tetraklorür (CCL4) ve *Amanita* mantarından doğabilecek toksik maddelerden koruduğunu göstermiştir (71, 75, 76).

Silimarin ve silibin in vitro olarak antioksidan ve antihepatotoksik etkili olduğu, silibin antienflamatuvar etki gösterdiğine dair dünya sağlık örgütünün (WHO) monograflarında yer almaktadır. Aynı monografta; Klinik Farmakoloji kapsamında standardize edilmiş silimarin preparatlarının alkol, organik bileşikler, ilaç ve toksinlerin neden olduğu hepatit, akut ve kronik hepatit tedavisinde etkili olduğuna dair bilgiler yer almaktadır (74).

### **2.3.1. Silimarinin Botanik Özellikleri ve Kimyasal Bileşimi**

Bitkinin sistematikteki yeri (77,78):

Bölüm : Spermatophyta

Altbölüm : Angiospermae

Sınıf : Dicotyledones

Altsınıf : Asteridea

Takım :Asterales

Familya : Asteraceae

Altfamilya : Asteroideae

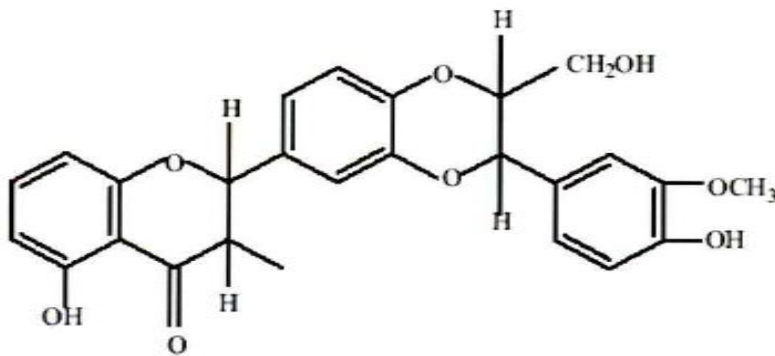
Cins : *Silybum* Adans.

Tür : *Silybum marianum* (L.) Gaertnerdir.

*Silybum marianum* (L.) Gaertner tür özellikleri ise; bitki 30-100 cm boylarındadır. Gövde boyuna yollu, ince uzun yumuşak tüylü, seyrek. Yapraklar tüsüz, soluk yeşil renklidir, damar boyunca beyaz benekli lekeler taşımaktadır, belirgin dentat dikenlidir. Bazal yapraklar derin triangular, loblu, obovat, saplı, 9-26 x 5-12 cm boyundadır. Üstteki yapraklar basit, ovat lanseolat. İnvolutrum 2,5-4 x 2-4 cm boyutlarındadır, filleriler yatık dikensi ovat, tabanda çok dik olarak genişlemiş ovat-subulat eklidir, dıştaki filleriler kıvrılmış içtekiler diktir, en içtekiler lanseolat ve ekli değildir. Kahverengimsi akenler siyah çizgilidir ve 7 x 3 mm boyundadır. Dış papus tüyleri yaklaşık 15 mm'dir. Çiçeklenme 4-5. aylardadır (77).

*Silybum marianum* (L.) Gaertner tohumlarının (meyveler) etken maddesi silimarin adı verilen flavonolignan karışımıdır. Flavonolignanlar, "taksifolol" adlı flavonol'e, koniferil alkol katılmasıyla oluşur. Flavonolignan karışımı bitkinin meyvelerinde %1,5-3 oranında bulunmaktadır. Silimarin'in silibin, silidianin ve silikristin adlı üç izomeri bulunur. Silibin'in de "A ve B" isimli iki izomeri vardır. Flavonolignan yapısında izosilibin A ve B, 2,3-dihidrosilibin, 2,3-dihidrosilikristin, 3- deoksisilikristin, 3-deoksisilidianin, izosilikristin, silandrin, silihermin, neosilihermin A ve B gibi izomerler de flavonolignan olarak sayılmaktadır (71, 73, 78, 79).

Bitki ayrıca taksifolin, kersetin, dihidrokemferol, kemferol, luteolin, apigenin, naringin, eriyodiktiyol ve krizoeriyol gibi flavonoitler içermektedir. %20-30 Oranlarında sabit yağ, steroller (beta-sitosterol, beta-sitosterol glukozit), dihidrokoniferil alkol, % 3,3 oranında fumarik asit, histamin, tiramin, vitamin C, E ve K, alkaloit, saponin, şeker, proteinler ve müsilaj içermektedir (71, 73, 79, 80).



Şekil 2.2. Silimarinin kimyasal formülü

### 2.3.2. Silimarin'in Genel Etki Mekanizması

Silybum marianum farmakolojik aktivitesini biyokimyasal özelliklerine dayanan iki temel etki mekanizma ile göstermektedir. İlki; bitkinin bileşenleriyle etkileşme ve antioksidan etkisinden dolayı hücre membranında protektif etkinin görülmesidir. Silimarin ve silibin protektif etkisini hücresel membranın üzerinde göstermektedir. Her iki bileşik DE, falloidin membranın dış yüzeyine bağlanmasını önlemesi ve toksinlerin membran transfer sistemini inhibe etmesi ile falloidin veya  $\alpha$ -amanitin gibi bazı toksinlerin absorpsiyonunu inhibe etme özelliği içermektedir. Ayrıca silimarin ve silibin; membranın lipit bileşenleri ile etkileşerek fiziksel ve kimyasal özelliklerine yönelik etki ettiğini düşünülmektedir. Silimarin hücre membranını lezyonlara karşı daha dirençli hale getirir (hemoglobulin, histamin ve enzimler gibi hücresel süstituentlerin akışını azaltmaktadır) bu da eritrositler, mast hücreleri, lökositler, makrofajlar ve izole edilmiş hepatositlerde kanıtlanmıştır (80).

Silimarin ve silibin, serbest radikallerin süpürücüsü olarak davranabilmeleri ve CCL4, talyum, EtOH, parasetamol ve diğer hepatoksinlerin neden oldukları karaciğer hasarındaki oluşan peroksidatif sürecini bloke etme özellikleri bulunmaktadır. Silimarin ve silibin serbest radikallerin yüklenmesini azalttığı, GSH seviyeleri arttırdığı ve SOD aktivitesini stimüle ettiğinden dolayı SOD ve GSH iki sistemin tüketimini önleyebilme özelliğini göstermektedir (80).

Silibin sadece hücre membranının düzeyinde değil, çekirdek içine nüfuz edebilir ve polimeraz I ve rRNA transkripsiyonunu stimüle ederek ribozomal protein sentezini arttırmaktadır. Protein sentezinin stimülasyonu; karaciğerde oluşan hasarın tamiri için önemli bir aşamadır ve hepatoksinlerin neden oldukları hasarlı enzim ve proteinlerin yerine geçmede temel oluşturmaktadır. Silibin; izole edilmiş sıçan karaciğerindeki DNA sentezini stimüle ederek hücre rejenarasyonun gerçekleştirilmesiyle Silybum marianum'un ikinci önemli etki mekanizmasını oluşturmaktadır (80).

### 2.3.3. Silimarinin Antioksidan Etki Mekanizması

Serbest radikaller; farklı maddelerin hepatotoksitate etkilerinin mekanizmasında ve enflamatuvar, iskemi, reperfüzyon, ateroskleröz, kanser ve yaşlılık gibi patolojik süreçlerde önemli bir rol almaktadır. LPO; oksijen, lipoperoksidler, peroksidler, endoperoksidler ve lipidik hidroperoksidlerin varlığında lipidik serbest radikallerin oluşmasının yanı sıra, stabil olmayan

serbest radikallerin membran lipitlerine (doymamış yağ asitleri) doğru girişlerini başlatarak kendini gösteren bir zincir reaksiyonudur. Serbest radikallere karşı GSH sistemi ve SOD iki temel fizyolojik savunma sisteminden bahsedilmektedir. Bu iki detoksifikasyon sisteminin, toksik maddelerin aşırı yüklenmesinin boşaltma ve tüketmesine yönelik fonksiyonları bulunmaktadır (80).

Silimarin ve silibin'in, fenolik yapılarından dolayı oksijen ve hidroksilik radikaller (HOO) gibi çok sayıda radikaller ile hücre dışı sistemlerde reaksiyona girerek daha stabil ve daha az duyarlı bileşikler oluşturarak antioksidan aktivite göstermektedir. Araştırmacılar; silimarin ve silibin'in sıçanların hepatik mikrozom ve mitokondrilerindeki lipit peroksidasyonunu inhibe ettiklerini tespit etmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, silimarin'in fare hepatik mikrozomlarında çeşitli monooksijenaz, CCL4'ü aktive eden enzimlerin etkilerini azalttığını ve CCL4 ve NADPH'in neden oldukları lipit peroksidasyonunda zincir kırıcı antioksidan gibi davrandığı gözlenmiştir. Valenzuela ve arkadaşları, sıçanlardaki silimarin'in ön tedavisinin, hemolitik ajanı olan fenilhidrazin nedenli hemolizden ve lipit peroksidasyondan eritrositleri koruduğunu bildirmişlerdir. Aynı etkiler ile birlikte oksijenin tüketimi ve methemoglobinin oluşumunun silibin dihemisüksinatı tarafından inhibe edildiği gözlenmiştir. Ayrıca silibin, silidianin ve silikristin peroksidaz gibi çeşitli peroksidatif enzimlerin aktivitelerine karşı inhibitör etki göstermişlerdir (80).

Mekanizması tam olarak bilinmemek ile birlikte, antioksidan aktivitesinden dolayı kısmi olarak; silimarin'in, nörotoksik ve nörodejeneratif durumlarda tedavi edici ve koruyucu özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir. Silimarin'in, mikroglial (gliyal hücrelerden merkezî sinir sisteminde bulunan makrofajlardır) hücrelerin aktivitesini inhibe ederek lipopolisakkarit nedenli nörotoksositeye karşı dopaminerjik nöronların korunmasında etkili olabildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte EtOH ile muamele edilen hamile sıçanlarda, silimarin'in fetal beyin ve karaciğerde kısmen olarak protektif aktivitesi olduğu gözlenmiştir. Bu protektif aktivitenin; lipopolisakkarit nedenli serbest radikallerin süpürücü aktivitesi ve protein sentezinin arttırmasıyla antioksidan rejenerasyonun stimüle edilmesi gibi farklı mekanizmalara bağlı olduğu düşünülmektedir (81).

Silimarin serbest radikal süpürücüsüdür, linoleat peroksidasyonuna neden olan Fe<sup>2+</sup>'yi indirgemektedir. Antioksidan etkisi silimarin'in bileşimindeki bulunan fenolik bileşiklerden ileri gelmektedir (79).

Silimarin ve silibin insan platelet ve fibriyoblastları, sıçan karaciğer ve mitokondrileri gibi çeşitli model sistemlerde hidroksil anyonları, fenoksi radikalleri ve hipoklöröz asit gibi serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek ve enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla üretilen serbest inorganik radikalleri kullanarak in vitro olarak antioksidan aktivite göstermektedir (74).

#### **2.3.4. Kardiyopulmoner Sistem Üzerinde Etki Mekanizması**

Amiodaron güçlü bir antiaritmik ilaçtır, sık ve bazen görülen çok güçlü yan etkilerinden dolayı kullanışı sınırlıdır. Amiodaron'un neden olduğu toksisitenin kapsamında serbest radikaller oldukça önemli bir yer almaktadır. Amiodaron toksisitesinin potansiyel mekanizması; doğrudan sitotoksikite olan lizozomal fosfolipidizisin gelişmesi ve dolaylı toksisite ise immünolojik nedenli toksik etkiler ve membran destabilizasyona kapsamaktadır. Silibin amiodaron ile birlikte uygulanması lizozomal fosfolipidozisi önemli derecede azaltmaktadır (82, 83). Silibin; özellikle çocuk ve yaşlılarda kanser tedavisinde kullanılan doksorubisin (adriamisin) gibi ilaçların kardiyotoksik etkilerine karşı oldukça güçlü bir kardiyoprotektif etki göstermektedir. Doksorubisin ile silibin kombinasyonu, akciğer tümöründe test edildiğinde silibin'in oral kullanımı ksenograft insan küçük olmayan karsinoma akciğer hücresinin A549 büyümesini baskılamıştır (athymic BALB/c *nu/nu* fare), diğer taraftan doksorubisin'in tedavi edici etkisini arttırmakla birlikte doksorubisin nedenli yan etkileri önlemiştir. Sitotoksik etkiler oluşmadan silibin zaman ve doza bağlı olarak metastatik A549 hücrelerin hareketi ve saldırganlığı inhibe edici bir etki gösterebilmektedir. Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak silibin'in tedavisi MMP-2 ve urokinaz plazminojen aktivatör (u-PA) oluşumunu azaltabilir, aynı zamanda metalloproteinaz-2'nin (TIMP-2) doku inhibitörünü arttırabilir (82).

Alerjik astımın erken safhasında silimarin koruyucu etki göstermiştir, bu etkinin flavonoitlerin histamine karşı az duyarlılığı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Silimarin duyarlı guinea domuzlarında aerosol antijen saldırının neden olduğu bronkospazma karşı koruyucu etki göstermiştir. Bu etkinin silimarin'in membranı stabilize etmesi, anienflamatuvar aktivitesi ve araşidonik asit sentezini inhibe etmesi gibi çeşitli biyolojik aktivitelerinden kaynaklandığı açıklanmıştır (82).

### **2.3.5. Silybum marianum (L.) Gaertner Literatüre Dayalı Kullanımı**

Tıbbi amaçla karaciğer ve mesane hastalıkları, sarılık, hepatit, karaciğer yağlanması, kronik dejeneratif karaciğer rahatsızlıkları, hepatit sonrasında görülen karaciğer fonksiyon bozuklukları ile alkol ve doku zehirleri gibi metabolik toksinlerin neden olduğu karaciğer hasarlarının önlenmesi ve tedavisi için kullanılır, aynı zamanda siroz, bazı kimyasallar ve Amanita phalloides mantarının neden olduğu zehirlenmeler ve kemoterapinin yan etkilerinin en aza indirilmesi için kullanılmaktadır. Drog, Komisyon E kayıtlarına göre; hazımsızlık şikayetlerinde, formülasyonları halinde toksik karaciğer hasarı ile kronik iltihaplı karaciğer hastalıklarının destekleyici tedavisinde ve hepatic sirozda dahilen kullanılmaktadır (74, 79, 84).

Milk thistle ve Dandelion (Taraxacum); Milk thistle, proantisiyanidinler ve biyoflavonoidler; Meryemana diken, zerdaçal (Curcuma), Artichoke (Cynara) ve Schisandra ile farklı kombinasyonlarının; siroz, hepatit, karaciğer hastalıkları, sedef hastalığı, safra taşı, sarılık ve böbrek rahatsızlıkları gibi durumlarda birincil kullanışları teşkil ederken alkolizm, kemoterapi olarak, kronik yorgunluk, mide ekşimesi, hipoglisemi, hazımsızlık, obezite, zehirlenme, varis, yağlanma gibi durumlarda sekonder kullanışları teşkil etmektedir (75).

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

Organ korunumuna ilişkin modern yaklaşımlara rağmen abdominal aortik anevrizmaların(AAA) tamirinde yapılan girişimler ciddi morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (85,86). 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 (87). 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 klempisi değildir. Antikoagülasyon için kullanılan heparin doğrudan antienflamatuvar etkiye sahiptir. Heparinin antienflamatuvar ve antikoagülasyondaki rolü çeşitli enzimler, hormonlar, biyojenik aminler ve plazma proteinleriyle ilişkilidir (86).

## **2.5. Total Antioksidan Seviye (TAS)**

Normal şartlarda organizma, endojen ve eksojen serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücutta meydana gelen oksidan durumların tamponize edilmesinde çok önemli bir rol oynayan kan, antioksidanların tüm vücuda dağıtılmasını sağlar (88).

TAS' a en fazla yarar plazmada mevcut olan antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest Fe'yi toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler ile birlikte serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Albümin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin % 85'inden fazlasını oluşturur. Bu fark kanda bilirubin, indirgenmiş glutation (GSH), flavanoidler, alfa-tokoferol ve beta-karoten gibi antioksidan maddelerin miktarının albümin, ürik asit ve askorbik asit miktarından az olmasından kaynaklanmaktadır. Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir antioksidan etki oluşmaktadır. Bu sinerjik etkiye örnek olarak; glutationun askorbatı, askorbatın da tokoferolü yeniden aktifleştirmesi verilebilir. Total antioksidan seviyesinin ölçümü, antioksidanların tek tek seviyelerinin ölçümünden daha değerli bilgiler verir. Bu yüzden kanın antioksidan düzeyi durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır(89,90).

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

Oksidatif stres, reaktif oksijen türevlerinin üretimi ile antioksidan kapasite arasındaki dengenin bozulması sonucu meydana gelir. Oksidatif stresin toplam değerine total oksidatif

stres veya total oksidan seviye denir. Pek çok patofizyolojik durumda, serbest radikal üretimi ile antioksidan kapasitenin bozulması sonucu oksidatif stres oluşur ve doku hasarı meydana gelir. Ateroskleroz, kalp yetmezliği, hipertansiyon ve iskemi/reperfüzyon hasarı reaktif oksijen türlerinin etkin rol oynadığı gösterilmiş kardiyovasküler hastalıklardan bazılarıdır (91).

## 2.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Total peroksidlerin, total antioksidanlara oranıyla elde edilen bir indekstir. OSI'nin yüksek olması oksidatif stresin arttığını gösterir (92,93).

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSI)} = \frac{\text{Total Oksidatif Stres (TOS)}}{\text{Total Antioksidan Status (TAS)}}$$



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Dollvet etik kurul onayı (Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 30.04.2012 tarih B.30.2.HRÜ.0.05.07.00/270 sayılı onay kararı alındıktan sonra, Çevre ve Orman Bakanlığı tarafından Resmi Gazete'nin 6 Temmuz 2006 tarih ve 2622 sayılı nüshasında yayımlanan Hayvan Deneyleri Etik kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına dair Yönetmelik ile Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine uygun olarak gerçekleştirildi.

#### 3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

15 adet ortalama ağırlıkları 240-300 gr olan Wistar-albino cinsi rat randomize olarak eşit sayıda (n = 5) 3 gruba ayrıldı. Çalışma öncesinde ratlar oda sıcaklığında ve 12 saat ışık, 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Bütün ratlar standart koşullar altında şebeke suyu ve standart rat yemi ile beslendi. Girişimden 8 saat önce tüm ratların beslenmesi kesildi.

#### 3.2. İskemi Reperfüzyon Hasarı Modeli

Deneyde kullanılan tüm ratlara 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 ratlara 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. 60 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 ratlarda 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; IAA'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 ratlarda, median laparotomi kesisi yukarıya doğru ilerletilerek mediasten açıldı, kalbe ulaşıldı ve 5 cc'lik enjektör yardımıyla sağ ventriküler boşluktan kan alındı. Abdominal aorttan doku örneği alındı. Kas doku örnekleri; immunohistokimyasal ve hematoksilen-eosin değerlendirme yapıncaya kadar %10'luk formaldehid solüsyonu içinde saklandı. Ratlardan alınan kanlar, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve rat plazma örnekleri biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -20 derecede saklandı.

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

Deneyde kullanacağımız silimarin %1'lik dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülerek intraperitoneal enjeksiyon için hazırlandı.

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

Deney için 3 grup oluşturuldu.

**Grup 1** (Sham, n=5): Çalışma 120 dk boyunca anestezi uygulaması dışında hiç bir işlem gerçekleştirilmeden midiline laparotomi yapıp doku ve kan örneği alındı.

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

**Grup 3** (İR + Silimarin n=5): Anestezi sonrası infrarenal abdominal aortaya 60 dakika iskemi ve 60 dakika reperfüzyon uygulandı. 200 mg/kg silimarin iskemi sonrası uygulandı. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

### **3.5. Vasküler Endotel Yapının Histopatolojik İncelenmesi**

Histopatolojik inceleme için aort dokuları ayrı ayrı %10'luk tamponlu nötral formaldehit çözeltisinde fikse edildi. Örnekler parafin bloklara gömülerek, 5 mikronmetrelik

kesitler alındı. Hematoksilen eozin boyası ile boyandı. 20 objektiflik büyütme kullanıldı. (Olympus BX51 TF, USA) Histopatolojik parametre olarak interstisyel ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve nekroz değerlendirildi. Yok:0 var:1 belirgin:2 olarak kabul edildi. Her örnek için tüm parametre skorları toplanarak histolojik skor belirlendi.

### **3.6. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Ölçümü**

Örneklerin total antioksidan seviyesi (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. Dokulardaki TAS sonuçları Trolox Equivalent/gram protein olarak ifade edildi.

### **3.7. Total Oksidant Seviyesi (TOS)**

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

### **3.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)**

Oksidatif Stresin bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSI), Toplam Oksidan Status/Seviye (TOS) düzeylerinin Toplam Antioksidan Status/Seviye (TAS) düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Örneklerin Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplanırken TAS düzeyleri  $\mu\text{mol}$  birimine çevrilir. 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 değeriendirilmesi 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.

## 4. BULGULAR

Bu çalışma 15 adet ratla yapıldı ve her grup 5'er adet olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Ratların tamamına çalışma protokolü uygulanarak, çalışma sonunda ratlardan kan ve doku örnekleri alındı ve ratlar sakrifiye edildi. Ratlardan alınan kan örneklerinde TAS, TOS ve OSİ parametreleri ölçülüp Gruplar arası istatistiksel olarak kıyaslandı (Tablo 1).

Patolog tarafından yapılan histopatolojik değerlendirmeler sonucunda elde edilen skorlar istatistiksel olarak kıyaslandı. Tüm gruplara ait ışık mikroskopi örnekleri Resim -1 'de sunulmuştur. Gruplara ait TAS, TOS ve OSİ karşılaştırılması Tablo 1 de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Gruplar Arası TAS, TOS ve OSİ 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>
SİLİMARİN	1.79±1,51 <sup>ab</sup>	55.81±17.25 <sup>b</sup>	5.44±1.51 <sup>c</sup>

$X \pm S_{\bar{x}}$  = Aritmetik ortalama±Standart hata. a, b, ve c harfleri gruplar arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.05$  düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ( $N=5$ ).

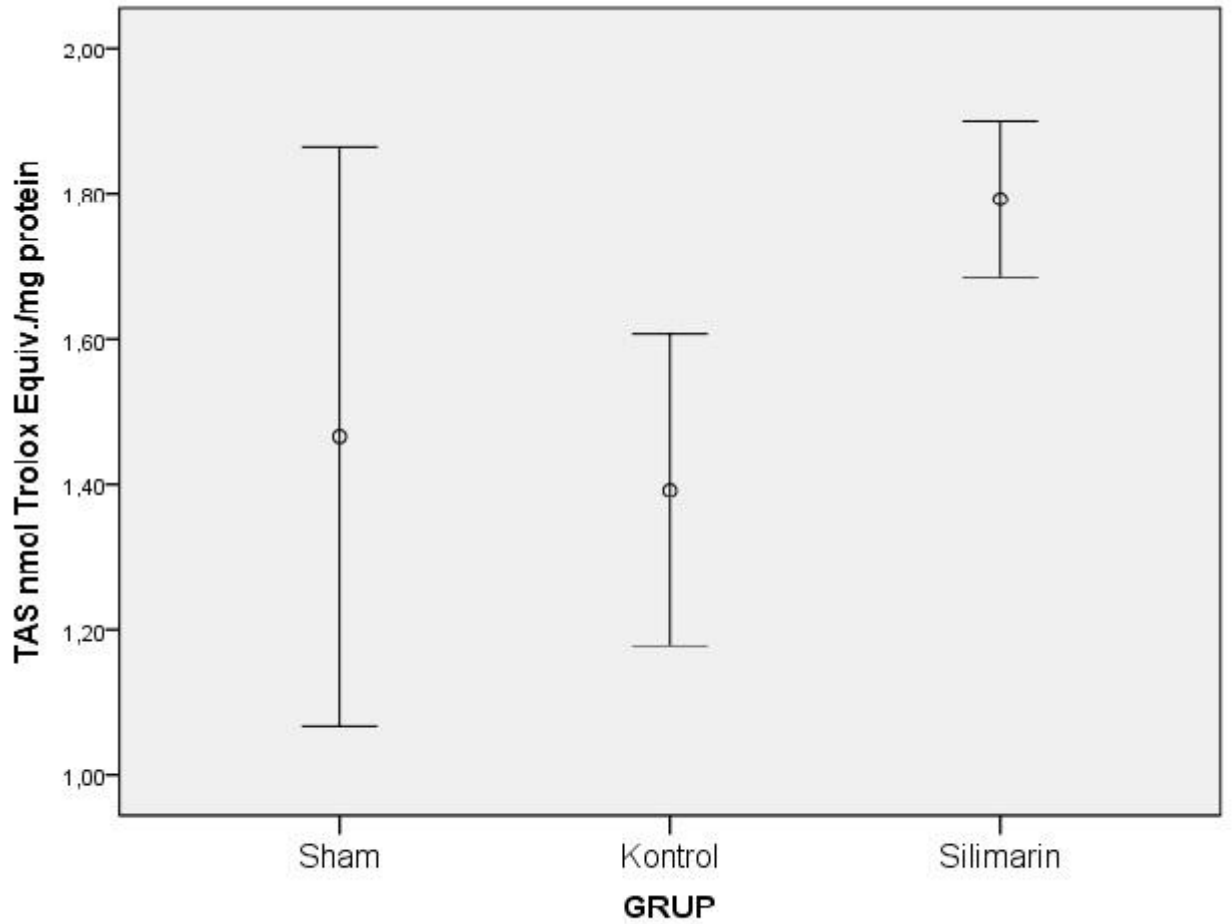
### 4.1. Grupların TAS Değerlerinin Karşılaştırılması

Alınan kan örneklerinde ortalama TAS değerleri hesaplandığında en düşük değerinin kontrol grubunda olduğu en yüksek değer ise Silimarin grubunda olduğu saptandı (Tablo 1).

TAS gruplar arasında kıyaslandığında;

1- Silimarin ve sham gruplarının TAS değerleri Kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ( $p<0.05$ ).

2- Sham grubu TAS değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi. ( $p<0.05$ ).



Grafik 4.1.: Gruplar arası TAS değerlerinin karşılaştırılması

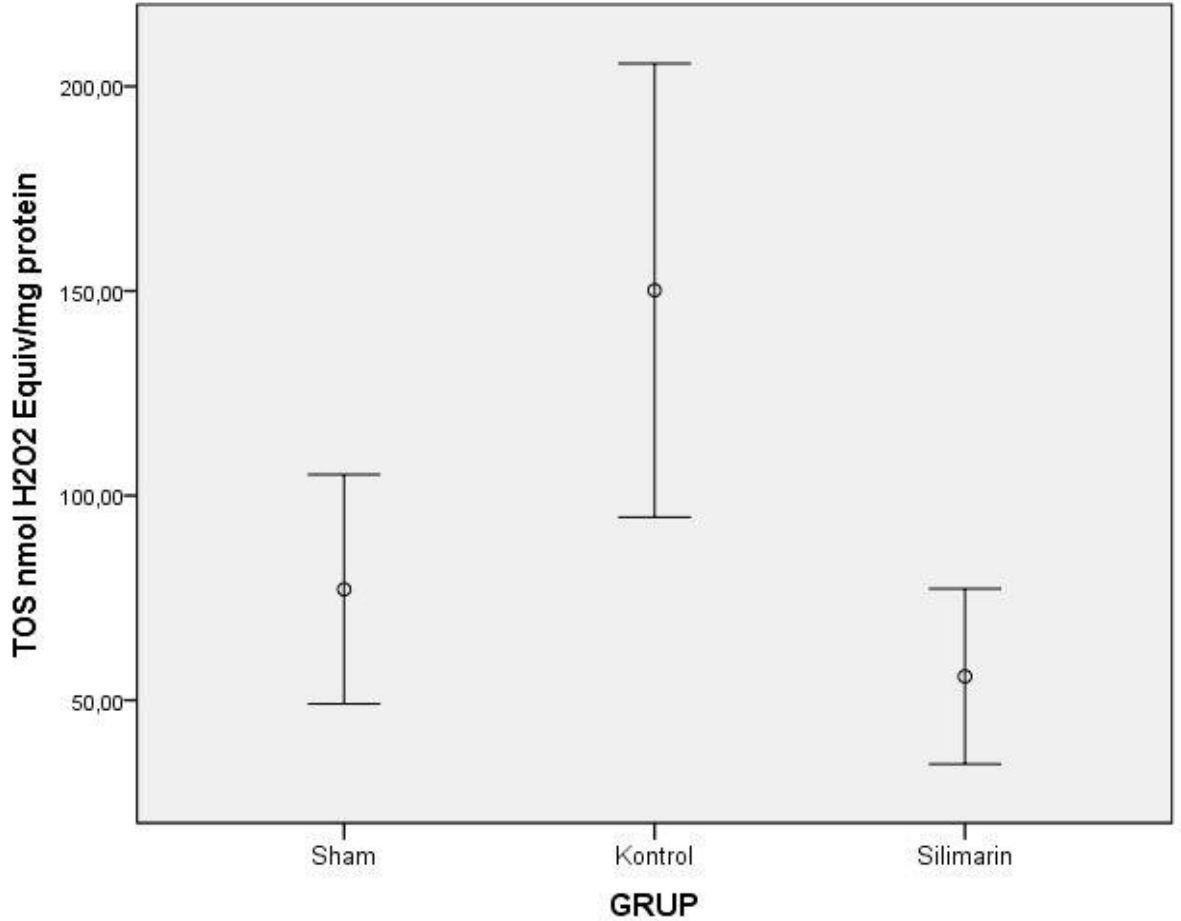
#### 4.2. Grupların TOS Değerlerinin Karşılaştırılması

Alınan kan örneklerinde ortalama TOS değerleri hesaplandığında en düşük değerinin Silimarin grubunda olduğu en yüksek değer ise Kontrol grubunda olduğu saptandı (Tablo 1).

TOS gruplar arasında kıyaslandığında;

1-Silimarin ve sham gruplarının TOS değerleri Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük tespit edildi ( $p<0.05$ ).

2- Sham grubu TOS değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük tespit edildi. Silimarin grubuna göre ise anlamlı olarak yüksek tespit edildi. ( $p<0.05$ ).



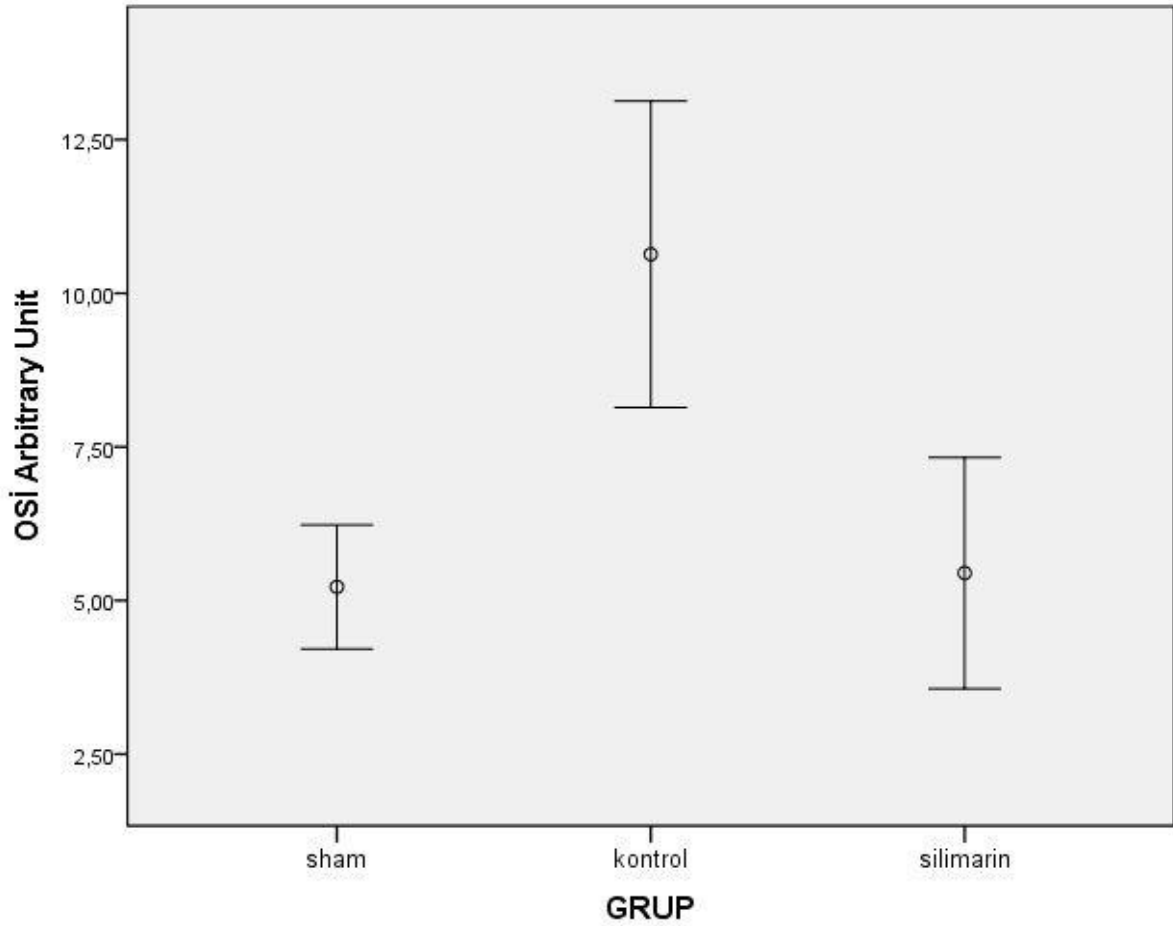
Grafik4.2: Gruplar arası TOS değerlerinin karşılaştırılması

### 4.3. Grupların OSİ Değerlerinin Karşılaştırılması

Alınan kan örneklerinde ortalama OSİ değerleri hesaplandığında en düşük değerinin Sham grubunda olduğu en yüksek değer ise Kontrol grubunda olduğu saptandı (Tablo 1 ).

OSİ gruplar arasında kıyaslandığında;

- 1- Sham ve Silimarin gruplarının OSİ değerleri Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük tespit edildi ( $p < 0.05$ ).
- 2- Sham grubu OSİ değeri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düşük tespit edildi. ( $p < 0.05$ ).

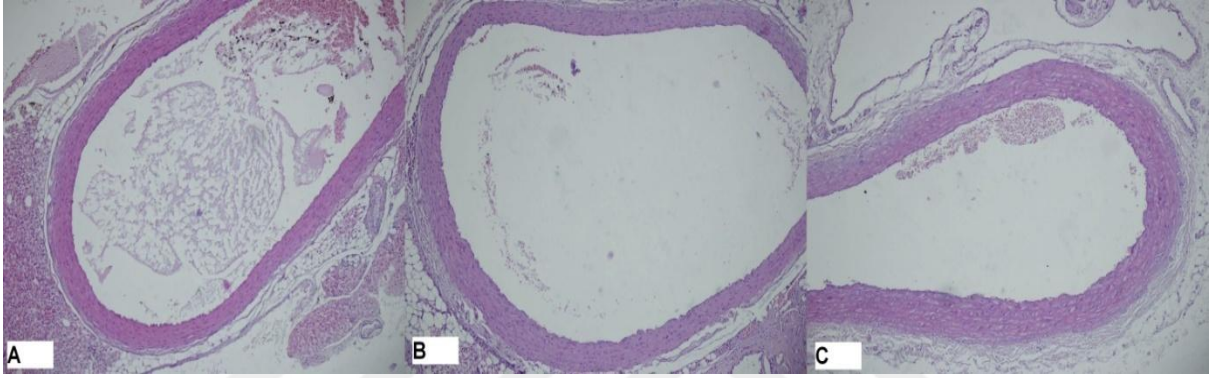


Grafik 4. 3: Gruplar arası OSİ değerlerinin karşılaştırılması

### 4.4. Grupların Histopatolojik Hasar Skorlarının Karşılaştırılması



Silimarin, sham, kontrol gruplarından alınan aort dokuları histopatolojik olarak değerlendirildi. Her örnek için tüm parametre skorları toplanarak histolojik skor belirlendi. Histopatolojik görüntülerden edilen verilere göre Sham, kontrol ve silimarin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. İskemi ve ardından yapılan reperfüzyon sonucu kanda oksidan ve antioksidan parametrelerde değişiklik olmuştur ancak aort dokusunda herhangi bir patoloji tespit edilememiştir.



**Resim 1.** Mikrovasküler klemp ile sıçan aortu oklüzyonunun vasküler endotel hasarı oluşturma etkisinin incelenmesi

## 5. TARTIŞMA

Arteriyel ya da venöz kan akımının azalmasına bağlı yetersiz perfüzyon sonucu, doku veya organların oksijen (O<sub>2</sub>)'den yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku hasarı oluşturarak hücre ölümüne yol açmaktadır. Geri dönüşümsüz hücre hasarının önlenmesi için dokuya kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) gerekmektedir. Ancak iskemik dokularda gerçekleşen reperfüzyon, iskeminin dokuda oluşturduğundan daha fazla hasara yol açmaktadır (1). İ/R sonucu meydana gelen kimyasal olaylardan oluşan serbest oksijen radikallerin Zararlı etkileri ,süpürücü etkisi olan antioksidanlar tarafından zayıflatılır yada ortadan kaldırılır. Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir (3).Silimarinin de antioksidan özelliği ve iskeminin oluşturduğu hasarı azalttığı araştırmalarla kanıtlanmıştır. Silimarin kuvvetli antioksidan, serbest radikal süpürücü ve hücre membranlarının stabilizasyonunda etkisi olan bir maddedir. Bu etkileri birçok çalışmada gösterilmiş olup hücre koruyucu etkisinde bu özelliklerinin rolü olduğu bildirilmektedir (94, 95, 96).

İran'da yapılan bir çalışmada, Parkinson hastalığı üzerindeki silimarin'in nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Unilateral intrastriatal 6-hidroksidopamin (6-OHDA) ile lezyon oluşturulmuş sıçanlara nörotoksin enjeksiyonundan 1 saat önce intraperitoneal olarak 100 ve 200 mg/kg dozlarda silimarin verilmiştir. Silimarin'in sadece 200 mg/kg dozu (6-OHDA) uygulanması ile lezyon edilmiş sıçanlarda rotasyonel tutumunu azaltarak kendi toksisitesine karşı SNC'in (substantia nigra parscompacta) nöronlarını korumuştur. Tedavi öncesinde verilen 200 mg/kg dozdaki silimarin, 6-OHDA'nın neden olduğu TBARS'ın oluşumunun azalmasına önemli derecede etki ettiği tespit edilmiştir. Silimarin'in, östrojenik yolağı ve oksidatif baskıyı kısmen azaltarak doza bağlı olarak 6-OHDA'nın toksisitesine karşı nöroprotektif etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (97).

Başka bir çalışmada diyet ile hiperkolesterolemi oluşturulmuş farelere silimarin verilmesi ile protokol etkisine benzer antihiperkolesteromik etki, HDL kolesterolünde artış, toplam ve safra kolesterolünde azalma gözlenmiştir (73).

Benzer bir çalışmada intragastrik yoldan 100 mg/kg dozda uygulanan silimarin sıçanlarda pilorik ligasyon ve soğuk stresin neden olduğu gastrik ülseri önlerken EtOH'ün

neden olduğu ülsere karşı etkili olmamıştır. İskemik reperfüzyon ile indüklenen gastrik hasarı önlemiştir (74).

Yüksek derecede metastatik özelliğe sahip olan A549 (insan akciğer kanseri) hücreleri farklı konsantrasyonlarda (100 µM'a kadar) silibin ile muamele edildiğinde, silibin'in bu hücrelerin yayılmasını önlediği gözlenmiştir. Silibin'in prostat kanseri hücrelerinde telomeraz aktivitesini inhibe ettiği ve kansere karşı koruyucu potansiyeli olduğu da gösterilmiştir (73).

Tek doz silimarin sıçan ve farelerde, mikrosistin-LR (mavi-yeşil alg olan *Microcystis aeruginosa* tarafında sentezlenen siklik heptapeptit yapısında güçlü bir hepatotoksin) zehirlenmesi ile indüklenen letal etkileri ve patolojik değişiklikleri tamamen ortadan kaldırmaktadır (73).



## 6.SONUÇ

Çalışmamız 3 grup olmak üzere 15 adet ratla yapıldı. Sham grubunda hiç bir işlem gerçekleştirilmeden doku ve kan örneği alındı. Kontrol grubunda abdominal aortaya klemp uygulanarak iskemi ve reperfüzyon uygulandı, ilaç verilmedi. Reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı. Silimarin grubunda ise abdominal aortaya klemp uygulanarak iskemi ve reperfüzyon uygulandı. iskemi sonrası Silimarin uygulandı ve reperfüzyon süresinin bitimine uyan saatte doku ve kan örneği alındı.

Alınan doku örneklerinden histopatolojik inceleme yapıldı ve Sham, kontrol ve Silimarin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Bunun nedeni aort dokusunun iskemi reperfüzyona dirençli olduğundan kaynaklandığı düşünüldü.

Alınan kan örneklerinde ise TOS ve OSI değerlerini kontrol grubuna göre daha düşük tespit ettik . OSI değerinin düşük olması oksidatif stresin azaldığını gösterir.

Sonuç olarak, bu bulgular ışığında kalp damar cerrahisinde kullanılan kros-klemp tekniğine bağlı olarak gelişen iskemi reperfüzyon hasarına karşı silimarinin koruyucu olduğu gözlenmektedir. Silimarinin antioksidan etkisine ek olarak değişik mekanizmalara bağlı koruyucu özellikleri bulunduğu literatürde rapor edilmişse de, bu çalışmanın kapsamı dahilinde koruyucu etkiyi oluşturan özelliklerinden birisinin de silimarinin antioksidan özelliğinden kaynaklandığı ve silimarinin iskemi reperfüzyonu hasarına karşı kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

## 7-KAYNAKLAR

- 1- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and preventations of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-8.
- 2- Pararajasingam R, Weight SC, Bell PR, Nicholson ML, Sayers RD. Prevention of renal impairment following aortic crossclamping by manipulation of the endogenous renal nitric oxide response. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19:396-9.
- 3- Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. Heinonen, M.. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999;47: 3954-3962.
- 4- Rangan U, Bulkley GB: Prospects for treatment of free radicalmediated tissue injury. *British Med Bulletin* 1983;49: 700-718.
- 5- Yalçın A.S. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 342 –334.
- 6- Uçar N, Saka D, Coşkun Ö, Sarı A Akciğerin Savunma Mekanizmaları Solunum Hastalıkları 2002; 13: 153-160
- 7- T. Ding, S. Tian, Z. Zhang, D. Gu, Y. Chen, Y. Shi, and Z. Sun, Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS, *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* 2001;26 :155-161.
- 8- C. Nencini, G. Giorgi, and L. Micheli, Protective efect of silymarin on oxidative stress in rat brain, *Phytomedicine* 2007;14:129-135.
- 9- H. De Groot and U. Rauen, Tissue injury by reactive oxigen species and the protective efect of avanoids, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1998;12 : 249-255.
- 10-A. Valenzuela, M. Aspillaga, S. Vial, and R. Guerra, Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in diferent tissues of the rat, *Planta Med.* 1989;55: 420-422.
- 11- J. Zhao, M. Lahiri-Chatterjee, Y. Sharma, and R. Agarwal, Inhibitory efect of a avonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stres and in-ammatory responses in SENCAR Mouse skin, *Carcinogenesis* 2000;21:811-816.
- 12- E. Bosisio, C. Benelli, and O. Pirola, E\_ect of avanoligans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes, *Pharmacol. Res.* 1992;25:147-154.
- 13-Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfüsion injury. *Surg Clin North Am*, 1992; 72: 65-83.

- 14-Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 1994; 81: 637-47
- 15-Rhodes RS, DePalma RG. Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet*, 1980; 150: 347-52 (Abstr)
- 16- Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
- 17-Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*, 1991; 42: 225-46
- 18-Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun*, 1989;7: 255-64.
- 19-Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 1992; 32 :33-42
- 20-.Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol*. 1988;254:768-74.
- 21-Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997 ;14: 195-203.
- 22-Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol* 2001; 15: 293-306.
- 23- Barton DHR, Zard SZ. Radicals: Their Importance in Synthetic Chemistry and Their Relevance to Biology. *Phil Trans R Soc Lond* 1085; 311:805.
24. Mearson FZ, Kagon VE, Kozlov YP, Belktna LM, Arkhipenko Y V . The role of Lipid Peroxidation in Pathogenesis of Ischemic Damage and The Antioxidant 1995; 9: 526-533
- 25- Acworth IN, Bailey B. Reactive Oxygen Species. In: *The handbook of oxidative metabolism*. Massachusetts: ESA Inc., 1997;1:4.
- 26- Angel MF, et al. Free Radicals: Basic Concepts Concerning Their Chemistry, Pathophysiology and Relevance to Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg* 1987; 79:990-7.
- 27- Bulkley GB. Free Radical-mediated Reperfusion Injury: A Selective Review. 1987;55:66-73.

- 28- Galat JA, et al. Postischemia Renal Dysfunction: The Limited Role of Xanthine Oxidase Generated Oxygen Free Radicals. *J Surg Res* 1990; 49:488-92.
- 29- Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *Faseb J*, 1995; 9: 526-533.
- 30- Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russel GI. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995; 3: 348-354.
- 31- Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radicalmediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 939: 200-215.
- 32- Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J SurgRes* 1996; 61: 469-472.
- 33-Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 738-747.
- 34-Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004; 70: 71-86.
- 35-Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-2523.
- 36-Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 481-497.
- 37-Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-1386.
- 38-Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia—reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162-170.
- 39-Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007; 376: 1-43.
- 40-Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol.* 1993; 16:119-26.

- 41-Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007; 68: 1363-1370.
- 42-Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* 1991; 42: 125-138.
- 43-Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* 1999; 101:148-160.
- 44- García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol.* 2008; 48:109-114.
- 45-Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo- Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22: 46-55.
- 46- Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S.Heinonen, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999; 47: 3954-3962.
- 47- Cao G., Prior, R.L. In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999; 27: 1173-1181.
- 48- Kaur, C., Kapoor, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables—the Millennium’s health. *International Journal of Food Science and Technology*, 2001; 36: 703–725.
- 49-Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *Faseb J* 1995; 9: 526-533.
- 50- Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *Apmis* 2007;115:81-103.
- 51- Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell’aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem.* 2008; 15: 1236-1248.
- 52- Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol* 1993; 9: 89-93.



- 53- Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429
- 54-Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1345- 1352.
- 55-Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
- 56-Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36: 1-9.
- 57-Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.
- 58-Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. *Pharmacol Ther* 1988; 37: 231–249.
- 59-Buscemi N, Vandermeer B, Hooton N, et al. Efficacy and safety of exogenous melatonin for secondary sleep disorders and sleep disorders accompanying sleep restriction: meta-analysis. *Br Med J* 2006; 332: 385–93
- 60-Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms* 2005; 20: 291–303
- 61- Arendt J. Melatonin. *Br Med J* 1996; 312: 1242–3
- 62-Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 376-386.
- 63-Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 2000; 7: 444-458.
- 64- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, 1995;1-60.
- 65- Bjorneboe A., Bjorneboe G., Drevon C. : Absorbtion, transport and distrubition of vitamn E. *J. Nutr.* 1990: 120; 233-242.
- 66-Brom J. Vitamins, Mineral and Nutrition. Crowe L. Medical biochemistry. Mosby, London. 1999; 114.
- 67-Mayes PA. Structure and function of the lipid-soluble vitamins. Harper's biochemistry. Barnes DA. McGraw-Hill, New york,2000;647-649.

- 68- González-Pérez O, Moy-López NA, Guzmán-Muñiz J. [Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine] *Rev Invest Clin.* 2008; 60: 58-67.
- 69- Silalahi J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr* 2002; 11: 79-84.
- 70- Von Elbe, J.H., Schwartz, S.J., "Colorants. In *Food Chemistry*", Ed. Fennema, O.R. Marcel Dekker Inc., New York, 1996;651-672 .
- 71- Başer, K.H.C.. *Devedikeni Silybum marianum (L.) Gaertner. Bağbahçe*, 2008;16: 22-23.
- 72-Baytop, T. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, İlaveli 2. baskı*, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 1999; 198-199.
- 73-Demirezer, Ö., Ersöz, T., Saraçoğlu, İ., Şener, B.. *Tedavide Kullanılan Bitkiler*. Ankara: Medikal & Nobel Tıp Kitabevi 2007.
- 74-World Health Organization. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. Vol. 2.* Geneva:2003; 300-311.
- 75-Tenney, L.M.H. *Milk Thistle; A Remarkable Flavonoid Antioxidant and Liver Protectant.* Woodland Publishing INC. USA.1995.
- 76-Heinrich, M., Joanne, B., Gibbons, S., Williamson, E.M. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.* England: Edinburgh London. 2004.
- 77-Davis, P.H.. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.5.* Edinburgh: Edinburgh University Press.1975.
- 78-Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M.. *Farmasötik Botanik*, Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 2004;319
- 79-Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C.. *PDR for Herbal Medicines. 3rd Ed.* Montvale, NJ: Thomson Healthcare, 2004; 566-569.
- 80-Morazzoni, P., Bombardelli, E. *Silybum marianum (Cardus marianus).* *Fitoterapia*, vol. LXVI, . 1995;1: 3-43.
- 81- Nencini, C., Giorgi, G., Micheli, L. *Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain.* *Phytomedicine*, 2007; 14: 129-135.
- 82-Kren, V., Walterova, D. *Silybin and silymarin- new effects and applications.* *Biomedical Papers*, 2005; 149, 1: 29-41.
- 83-Gazak, R., Walterova, D., Kren, V.. *Silybin and silymarin- New and emerging applications in medicine.* *Current Medicinal Chemistry*, 2007;14: 1-24.

- 84-Brown, D.. New Encyclopedia of Herbs and Other Uses. London: DK Publishing. 2001;368.
- 85- Iong 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;8:1
- 86— Yener A.M., Çiçek M.C., Genç S.B., Özkan T., Doğan E., Bilgin B.Ç., Akın 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
- 87- Pulathan Z., Altun, 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, Volume 2014: 8:57-109.
- 88- Yao JK, Reddy R, McElhinny LG, et al. Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. Schizophr Res, 1998; 31: 1-8.
- 89- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. Free Radic Biol Med, 2000; 29: 1106-14.
- 90-Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clin Biochem, 2004; 37: 112-9.
- 91-Lakshmi, S. V., G. Padmaja, et al. "Oxidative stress in cardiovascular disease." Indian journal of biochemistry & biophysics. 2009;466: 421-440.
- 92-Harma M, Erel O. Oxidative stress in women with preeclampsia. Am J Obstet Gynecol, 2005; 192: 656-657.
- 93- Harma M, Erel O. Measurement of the total antioxidant response in preeclampsia with a novel automated method. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2005; 118: 47-51.
- 94-Asghar, Z., Masood, Z.: Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxy radicals in vitro. Pak. J. Pharm. Sci., 2008;21: 249-254.
- 95- Basiglio, C., Sanchez Pozzi, E.J., Mottino, A.D., Roma, M.G.: Differential effects of silymarin and its active component silibinin on plasma membrane stability and hepatocellular lysis. Chem. Biol. Interact., 2009;179: 297-303,.

96- Köksal, E., Gülcin, I., Beyza, S., Sarikaya, O., Bursal, E.: In vitro antioxidant activity of silymarin. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.*, 2009; 24: 395-405.

97-Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., Mafakheri, M. Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. *NeuroscienceLetters*, 2010;480: 206-210.

