

Karaciğer İskemi Reperfüzyonu Sırasında Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Karşı Gallik
Asitin Olası Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Ayşe Özmen

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2011

The Examination of Possible Protective Effects of Gallic Acid Against Damage of
Oxidative Stres During Induced Experimental Liver Ischemia-Reperfusion

Ayşe Özmen

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

August 2011

Karaciğer İskemi Reperfüzyonu Sırasında Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Karşı Gallik
Asitin Olası Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Ayşe Özmen

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Mediha Canbek

Ağustos 2011

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ayşe Özmen'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Karaciğer İskemi Reperfüzyonu Sırasında Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Gallik Asitin Olası Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mediha CANBEK

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS

Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Pınar ÖZTOPÇU VATAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gökhan BAYRAMOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu tez çalışmasında sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan karaciğer iskemi/reperfüzyon (İR) hasarına karşı, antioksidan özelliği bilinen gallik asitin olası koruyucu etkileri araştırıldı.

Çalışmada 28 adet 3-4 aylık *Sprague-dawley* cinsi dişi sıçanlar kullanıldı (n=7). Bunlar rastgele seçimle 4 gruba ayrıldı. Grup I (Sham Grubu), Grup II (İR + Serum Fizyolojik), Grup III (İR + 50 mg/kg gallik asit), Grup IV (İR + 100 mg/kg gallik asit) olarak belirlendi. Grup I ve II'e serum fizyolojik (1 ml/kg), Grup III ve IV'e sırasıyla 50 mg/kg, 100 mg/kg dozlarındaki gallik asit, (serum fizyolojik içinde çözdürülerek 1 ml/kg) 1 hafta boyunca günde 1 kere oral yolla verildi. Grup I'e laparotomi yapıldı ve hepatik arter, portal ven ve safra kanalları çevre dokulardan temizlendikten sonra başka hiçbir işlem uygulanmadan kapatıldı. Grup II, III ve IV için iskemi süresi 45 dakika, reperfüzyon süresi ise 60 dakika olarak belirlendi. Deney sonunda kan serumunda Alanin aminotransferaz (ALT), Aspartat aminotransferaz (AST) aktivitelerine ve karaciğer örneklerinde Katalaz (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (Gpx) enzim aktiviteleri ölçüldü. Doku kesitleri Hematoksilin&Eozin ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Çalışma sonunda İ/R hasarının, Grup I ile Grup II 'nin ALT ve AST değerleri karşılaştırıldığında Grup II'de yükseldiği ve bunun sonucunda İ/R hasarının oluşturulduğu gözlemlendi. Gallik asit uygulaması sonucunda CAT ve Gpx aktivitelerinin kontrol değerine yaklaşarak hasarı önlediği görüldü. Buna göre 50 mg/kg gallik asitin, 100 mg/kg gallik asite göre daha etkili olduğu düşünüldü. Elde edilen histolojik bulgular da bu sonuçları destekler nitelikteydi.

Çalışmanın sonucu karaciğer İR hasarına gallik asitin koruyucu etkili olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, İskemi/Reperfüzyon, Gallik Asit, Serbest Radikal, Sıçan

SUMMARY

In this thesis study, possible protective effects of gallic acid, which is known to be antioxidant, were investigated against experimentally induced liver ischemia/reperfusion (IR) injury in rats.

In the study, three to four month, *Sprague-dawley* type 28 female rats were used (n=7). They were separated to 4 groups randomly. Groups were determined as follows: Group I (Sham Group), Group II (IR + normal saline), Group III (IR + 50 mg/kg gallic acid), Group IV (IR + 100 mg/kg gallic acid). Groups I and II were inoculated normal saline (1 ml/kg), Group II and IV were inoculated 50 mg/kg and 100 mg/kg of gallic acid respectively (via solving in normal saline, 1 ml/kg) through oral routine once a day for one week. Laparotomy was performed to Group I, hepatic artery, portal vein and bile ducts were cleaned from peripheral tissues and then closed without any further operations. For Group II, II and IV, ischemia and reperfusion durations were determined to be 45 mins and 60 mins respectively. At the end of the experiment, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activities in blood, Catalase (CAT) and glutathione peroxidase (Gpx) enzyme activities in liver samples were measured. Histological sections were stained by Hematoxylen & Eosin and investigated by light microscope.

At the end of the study, when Group I and Group II's ALT and AST values of (I/R) injury were compared, it was determined that there was an increase in Group II and as a result of this, I/R injury was formed. It was observed that, injury recovered by CAT and GPx, which became less active by gallic acid, and has approached to control value. 50 mg/kg gallic acid was thought to be more effective when compared to 100 mg/kg gallic acid. Histological findings were supporting these results too.

Result of the study showed that gallic acid has protective effect liver I/R injury.

Key Words: Liver, Ischemia/Reperfusion, Gallic Acid, Free Radical, Rat

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarımda, bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan ve bilimsel ilerlememde emeği olan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mediha Canbek' e teşekkür ederim.

Bana bilim sevgisini aşıl原因an bilimin fedakarlık, sevgi, anlayış olduğunu öğreten değerli hocalarım; Yrd. Doç. Dr. Gökhan Bayramoğlu ve Arş. Gör. Dr. Hakan Şentürk'e minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda emeklerini ve zamanlarını harcayan ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mustafa Uyanoğlu, Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Bayramoğlu ve Arş. Gör. Dr. Emre Ceyhan'a teşekkür ederim.

Tez araştırmalarımın laboratuvar deneyleri aşamasında samimi destekleri ile yardımcı olan Selin Engür, Dilek Malay, Betül Müjdecı, Betül Asutay, Sevil Arabacı, Başak Durmuş, Ahmet Özen, Özgül Özalp, Özge Turgak arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Emekleri ile karşılığını ödeyemeyeceğim, bana olan güven ve inançlarını sonsuz hissettiren, tüm dert ve sıkıntılarında yanımda olan başta annem Döndü Özmen ve babam Mustafa Özmen olmak üzere değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇLAR.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer	3
2.1.1. Karaciğer anatomisi	3
2.1.2. Karaciğer histolojisi.....	4
2.1.1.1. Karaciğer hücreleri	6
2.1.3. Karaciğer Biyokimyası	8
2.2. Karaciğer İskemi Reperfüzyonu	9
2.3. Serbest Radikaller	13
2.3.1. Serbest radikallerin oluşması.....	13
2.3.2. Serbest oksijen radikalleri (SOR) ve oksidatif stres.....	14
2.3.2.1. Süperoksit radikali (O ₂ ⁻)	14
2.3.2.2. Hidrojen Peroksit Radikali (H ₂ O ₂)	15
2.3.2.3. Hidroksil Radikali (OH [·]).....	16
2.3.2.4. Singlet Oksijen (·O ₂)	17
2.3.2.5. Nitrik Oksit (NO [·])	17

İÇİNDEKİLER (devam)

2.3.3. Serbest Radikallerin Kaynakları.....	18
2.3.4. Serbest radikallerin etkileri.....	21
2.4. Antioksidanlar	21
2.4.1. Endojen (doğal) antioksidanlar.....	22
2.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)	22
2.4.1.2. Glutasyon peroksidaz (Gpx).....	24
2.4.1.3. Katalaz (CAT).....	24
2.4.2. Eksojen antioksidanlar.....	25
2.4.3. Antioksidanların etki etme şekilleri.....	25
2.5. Fenolik Maddeler	27
2.5.1. Flavonoidler.....	29
2.5.2. Fenolik asitler	30
2.5.2.1. Gallik asit.....	31
3. MATERYAL METOD	34
3.1. Deney Hayvanları.....	34
3.2. Deney Grupları.....	34
3.3. Gallik Asit Uygulaması.....	35
3.4. Cerrahi İşlemler.....	35
3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi	36
3.5.1. Doğal jel elektroforezi	38
3.5.1.1. Çözeltiler.....	38
3.5.2.2. Karaciğer doku örneklerinin histolojik analizleri	41
3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	41
4. SONUÇLAR	42

İÇİNDEKİLER (devam)

4.1. Biyokimyasal Analizler.....	42
4.1.1. Serum örneklerinde biyokimyasal analizler	42
4.2. Karaciğer Doku Örneklerinde Elektroforetik Analizler.....	44
4.3. Karaciğer doku örneklerinin histolojik analizleri	47
5. TARTIŞMA	51
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Karaciğer anatomisi.	4
2.2. Karaciğer Lobülü	5
2.3. Araşidonik Asit Metabolizması.....	20
2.4. Flavonoidlerin temel yapısı.....	29
2.5. Flavonoid alt sınıfları	30
2.6. Bitkisel kaynaklı bazı fenolik asit çeşitleri	30
2.7. Gallik asitin Yapısı.....	31
2.8. Hidrolize olabilen tanenlerden gallotanen ve gallik asit	32
4.1. Grup I, II, III ve IV'e ait serum AST seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	43
4.2. Grup I, II III ve IV'e ait serum ALT seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.....	43
4.3 Grup I, II, III, IV'e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen CAT enzim aktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri.....	45
4.4. Gruplara ait CAT izoenziminin elektroforetik bandlar	45
4.5. Grup I, II, III, IV 'e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen Gpx enzim aktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri.....	46
4.6. Gruplara ait Gpx izoenziminin elektroforetik bandları	46
4.7. Grup I'e ait karaciğer doku örneklerinde vena centralis ve kordon şeklinde sıralanmış hepatosit hücreleri.....	48
4.8. Grup II'e (İ/R grubu) ait karaciğer doku örneklerinde vena centralis ve bütünlüğü bozulmuş hepatosit hücreleri, genişlemiş sinosoid alanları, hiperemi.....	48
4.9. Grup II'e (İ/R grubu) ait karaciğer doku örneklerinde hiperemi.....	49
4.10. Grup II'e (İ/R grubu) ait karaciğer doku örneklerinde vakuolizasyon ve hiperemi.....	49
4.11 Grup III'e ait karaciğer doku örneklerinde vena centralis ve hepatosit sıraları, normal görünümlü sinosoidler, hafif hiperemi	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

4.12. Grup IV'e ait karaciğer doku örneklerinde vena centralis ve hepatosit sıraları, genişlemiş sinosoidler ile hafif hiperemi.	50
---	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Serbest Oksijen Radikalleri Kaynakları.....	19
2.2. Bilinen endojen antioksidanlar ve etkiler	23
2.3. Başlıca eksojen (farmakolojik) antioksidanlar ve özellikleri.	26
4.1. Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen AST, ALT miktarlarının ortalama değerleri \pm standart hata değerleri (n=7).....	42
4.2. Deney gruplarına ait hayvanların karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen CAT ve Gpx enzim aktiviteleri sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
n	Denek sayısı (Adet)
rpm	devir/dakika
dk	dakika
mL	mililitre (10^{-3} litre)
mg	miligram (10^{-3} gram)
1/kg	1/kilogram
mM	milimolar(10^{-3} molar)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
SOR	Serbest oksijen Radikalleri
İ\ R	İskemi/Reperfüzyon
Bkz	Bakınız
CAT	Katalaz
SOD	Süper Oksit Dismutaz
Gpx	Glutasyon peroksidaz
KO	Ksantin oksidaz

KDH	Ksantin dehidrogenaz
NOS	Nitrik oksit sentetaz
NAPDH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PUFA	Poliansatüre yağ asiti
ICAM	İntersellüler adezyon molekülü
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
IL-1	Interleukin-1
ET	Endotelin

1. GİRİŞ VE AMAÇLAR

Karaciğer yaşam için hayati bir organdır ve birçok önemli görevi vardır. Sindirim sistemi ile dolaşım sistemi arasında bir köprü görevi görür (Dilek, 2003). Karbonhidratları glikojen olarak depolayıp enerji gereksinimi için düzenli olarak kana glikoz verir, kana gelen ilaçların ve potansiyel toksik maddelerin detoksifikasyonu, safra oluşumunu ve plazma proteinlerinin sentezlenip kana verilmesini sağlar (Dilek, 2003; Porth, 2003).

Klinik alanda cerrahi işlemler sırasında kanamayı kontrol altında tutmak için karaciğerin tamamının ya da bir kısmının kan akımının durdurulması gerekir (Pringle manevrası) ve iskemi reperfüzyon (İR) hasarı kaçınılmaz olur (Watanabe, et al., 2001; Seo and Lee, 2002; Chen, et al., 2011). Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle (özellikle vasküler cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu esnasında) yetersiz hale gelmesine veya durmasına iskemi denir (Yaylak, et al., 2008). Reperfüzyon ise dokuya kan akımının yeniden sağlanmasıdır (Montalvo-Jave et al., 2008). Reperfüzyon, sadece iskemi sonucu oluşan hasara göre doku ya da organlarda daha ciddi hasara neden olur (Canbek, et al., 2008). Reperfüzyon hasarının en önemli sebeplerinden biri ise serbest oksijen radikallerinin (SOR) ortaya çıkmasıdır.

Serbest radikaller dış yörüngelerinde çiftleşmemiş tek bir elektron bulunan kimyasal türevlerdir. Bunlar son derece değişken olup kolayca inorganik ve organik kimyasallarla reaksiyona girerler (Kumar, et al., 2003). Serbest radikallerin oluşum hızı, organizmanın bunları etkisiz hale getiren veya azaltan katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (Gpx) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi endojen antioksidan enzimlerden oluşan savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece, organizma serbest radikallerden etkilenmez. Fakat radikal oluşum hızı savunma sisteminin hızını aşarsa,

serbest radikaller zararlı olmaya başlar ve organizmada oksidatif stres olarak ortaya çıkar (Şentürk, 2008).

Polifenoller birçok sebze, meyve, çay ve kırmızı şarap gibi içeceklerde bulunan ve yapısında esas olarak flavonoidler ve fenolik asitleri içeren bileşiklerdir (Ekbul, 2004). Hidroksibenzoik asit, hidroksisinamik asit gibi fenolik asitler sebze ve meyvelerin yapısında bulunan antioksidan bileşiklerdir. Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) brokoli, patlıcan, kuşkonmaz gibi sebzelerde bol bulunan doğal fenolik bileşiktir. Gallik asitin günlük alımında antioksidan, antimutajenik, antikanserojen aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Hsu & Yen, 2007).

Bu çalışmada; karaciğer iskemi reperfüzyonu sırasında oluşan oksidatif stres hasarına karşı antioksidan özelliği iyi bilinen gallik asidin biyokimyasal, histopatolojik ve doğal jel elektroforez yöntemiyle ne derece koruyucu etkisi olduğu araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

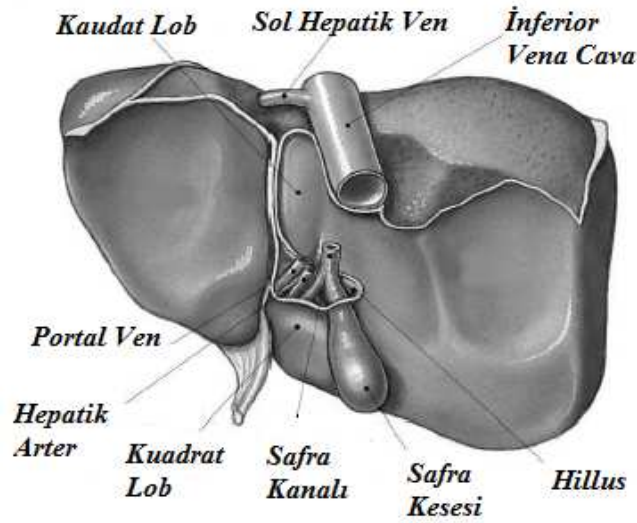
2.1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğer anatomisi

Karaciğer, insan vücudunun en büyük salgı bezi olarak kabul edilir. Büyük bölümü karın boşluğunun sağ üst ve orta kısmında yer alır ve doğrudan diyafram ile komşuluk yapar. Ağırlığı yaklaşık 1500 gr kadardır. Bazı bölümler dışında karaciğer, büyük kısmı ile ince periton ile sarılmıştır. Peritonun hemen altında sıkı bağ dokusundan yapılmış Glisson Kapsülü bulunur (Ortuğ, 2001). Bu kapsül karaciğer kapısı anlamına gelen (Ortuğ, 2001) porta hepatis (hilum) denilen bölgede kalınlaşır. Organa giren ve çıkan damarlar, sinirler ve safra kanalları hilumdaki bağ dokusu kılıfının içerisinde organa giriş ve çıkış yaparlar. Hilumdan organ içerisine giren bağ dokusu bölmeleri gittikçe incelenerek içindeki damar ve sinirlerle beraber ilerler ve karaciğer loblara ve en küçük yapısal birimi olan lobüllere ayrılır (Dilek, 2003). Lobüller 0,7-2 mm boyutlarında poligonal bir doku kitlesidir. Lobülleri ayıran bu bağ dokusu insanlarda daha az gelişmiştir (Demir, 2006).

Karaciğer ürettiği safra nedeniyle ekzokrin bir bez, sentezlediği bazı maddeleri doğrudan kana vermesi nedeniyle de endokrin bir bez niteliği taşımaktadır. Karaciğerin sindirimdeki rolü dışında birçok fonksiyonu daha vardır. Karbonhidratları glikojen olarak depolayıp enerji gereksinimi için kana glukoz vermek, potansiyel toksik maddelerin oksidasyon yoluyla zararsız bileşiklere çevrilerek safra ile ince bağırsaklara atılması, plazma proteinlerini sentezleyip kana verilmesi şeklinde özetlenebilir (Dilek, 2003).

Üst ve ön yüzden bakıldığında karaciğerin iki büyük loba ayrılmış olduğu görülür. Bunlara sağ lob ve sol lob adı verilir. Bir de sağ ve sol loblara ilave olarak caudate (kaudal) lob ve quadrate (kuadrat) lob adı verilen kısımlar da görülebilir (Ortuğ, 2001). (Bkz. Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Karaciğer anatomisi (Van der Plaats, 2005).

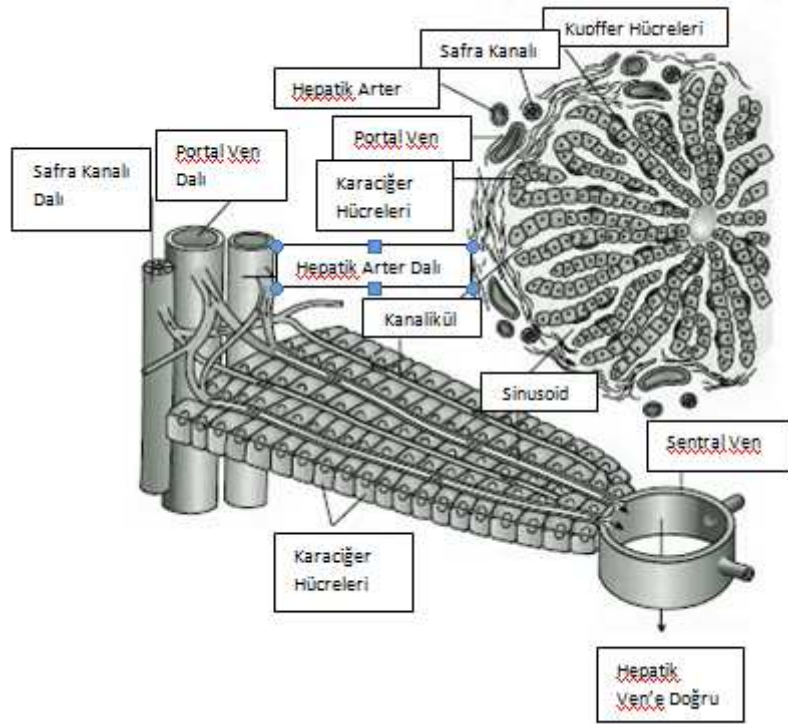
2.1.2. Karaciğer histolojisi

Karaciğerin başlıca yapısal elemanları şunlardır:

- Hücre kordonları şeklinde organize olmuş hepatositler
 - Bağ dokusundan oluşan stroma
 - Stroma içerisinde ilerleyen kan damarları, sinirler, lenf damarları ve safra kanalları
 - Hepatosit kordonları arasında yerleşmiş olan sinüzoidler (Bulucu, 2004).
- (Bkz.Şekil 2.2)

Bir karaciğer lobülünün komşu lobüllerle birleştiği köşelerde ince bağ dokusu artarak genişler ve üçgen ya da dörtgen alanlar şeklinde izlenir. Lobüllerin kesiştiği bu genişlemiş bağ dokusu alanlarına Portal Alan veya Portal Aralık veya Kiernan Aralığı

denir. Burada hepatic arterin dalı, vena portanın dalı, safra boşaltım kanalı bulunur ve bu üç yapıya portal triad adı verilir (Dilek, 2003). Karaciğerin yapısal organizasyonunu ve bu yapı elemanlarının birbirleri ile olan fonksiyonel ilişkilerini açıklamak için üç farklı lobül birimi tanımlanmıştır (Demir, 2006; Dilek, 2003).



Şekil 2.2. Karaciğer Lobülü (Porth, 2003)

Klasik karaciğer lobülü, köşelerinde portal alanlar, ortada ise vena santralinin yer aldığı kabaca altıgen şekilli yapılardır. Hepatositler merkezden perifer doğru hücre kordonları şeklinde kümeler oluşturarak uzanırlar. Kordonlar arasındaki bölgede ise sinüzoidler yer almaktadır (Dilek, 2003).

Portal lobül, safranin salgılanışı göz önüne alınarak yapılmıştır. Portal aralık içindeki bir safra ductusuna safra veren komşu karaciğer hücreleri portal lobül olarak gruplanırlar. Üç klasik karaciğer lobülünün vena sentralislerin birleştirilmesiyle portal lobülün sınırları çizilir. Enine kesitte üçgen şeklindedir (Bulucu, 2004).

Hepatik asinüs, diğer iki modele göre daha fonksiyonel ve daha fazla kabul gören bir modeldir (Demir, 2006). Karaciğer asinüsünde sınırlar bir hepatik arterin son dalı ile belirlenmektedir. Lobüller arasında ilerleyen interlobüler ven (vena portanın lobüllerdeki dalı) komşu iki lobüle dağılmaktadır. Enine kesitte baklava dilimi şeklindedir. Portal vene yakınlığı dikkate alınırsa asinüs hücreleri üç zona ayrılır (Bulucu, 2004). Zonlar vene yakınlığına bakılarak oksijenlenmede ve beslenmede farklılık gösterir (Demir, 2006). Çünkü Portal venden ve hepatik arterden gelen kan lobülün periferinden merkeze doğru akar. Bu nedenle oksijen ve metabolitler ile bağırsaklardan emilen diğer bütün toksik olan ve olmayan maddeler önce lobülün çevresindeki hücrelere daha sonra merkezindeki hücrelere ulaşır (Aytekin ve Solakoğlu, 2006). Portal vene yakın olan, oksijen ve besin maddelerinden zengin olan bölge I'dir. Merkezi vene yakın olan oksijen açısından fakir olan bölge III'tür. Bölge II ise oksijen ve besin maddeleri açısından ara durumdadır (Demir, 2006). Bölge I hücreleri karaciğere gelen kanda bulunan besin ve toksinlerle ilk olarak karşılaşan, safra kanalı tıkanmalarını takiben ortaya çıkan değişikliklerin ilk olarak gözleendiği hücrelerdir. Kan dolaşımı bozulduğunda bu hücreler en son ölür. Bölge III'te yerleşen hücreler ise iskemik nekrozdan ilk olarak etkilenen hücrelerdir. İlk yağ birikiminin bu hücrelerde gözleendiği ve toksik maddelere cevabın en son bu zonda geliştiği bildirilmektedir (Bulucu, 2004).

Bu şekilde yapılan düzenleme sayesinde hepatositlerin çeşitli toksik maddelere karşı ya da değişik hastalıklarda farklı derecelerde hasar görmelerinin nedeni açıklanmaya çalışılır (Dilek, 2003).

2.1.1.1. Karaciğer hücreleri

Hepatosit bir hepatik lobülün fonksiyonel olan ekzokrin ve endokrin hücrelidir. Nükleusları büyük ve yuvarlaktır. İki çekirdekli olan hücrelere de rastlanır. Yaralanma sonrasındaki tamir evresinde hepatositlerde bol mitozla rastlanır (Aksoy, 2007).

Ortalama 20-35µm çapında poligonal hücrelerdir. Karaciğer hücrelerinin ortalama %80'ini meydana getirirler. Her bir hepatositin yüzey komşulukları; komşu hepatosite sıkıca temas eden yüz, safra kanalikülüne bakan yüz ve sinüzoidlere bakan yüzünden meydana gelmektedir. Hepatositlerin sinüzoidlere bakan yüzünde hücre membranında çok sayıda mikrovilluslar bulunur. Hepatosit ile sinüzoidleri döşeyen endotel hücreleri arasındaki boşluğa Disse Aralığı (subendotelial boşluk) denir. Sinüzoidlerdeki kan disse aralığında doğrudan kan ile temas halindedir (Dilek, 2003).

Her bir hepatositte yaklaşık iki bin mitokondri bulunur. Hepatosit lizozomları hücre içi organellerin yıkımı ve dönüşümü için önemlidir (Aytekin ve Solakoğlu, 2006). Lizozomlar yaşlanmış olan plazma glikoproteinlerini yıkıma uğrattır (Demir, 2006).

Peroksizomlar da lizozomlar gibi enzim içeren ve hepatositlerde bol miktarda bulunan organellerdir. Peroksizomların işlevlerinden bazıları; fazla yağ asitlerinin oksidasyonu, bu oksidasyon sonucunda oluşan hidrojen peroksitin yıkılması (katalaz aktivitesi yoluyla) pürinlerin fazlasının ürik aside yıkılması (Aytekin ve Solakoğlu, 2006), alkolün asetaldehite dönüştürülmesidir (Aksoy, 2007).

Golgi kompleksleri de bol miktarda vardır. Bu organelin işlevi arasında lizozomların oluşturulması ve plazma proteinlerinin, glikoproteinlerin ve lipoproteinlerin salgılanması vardır (Aytekin ve Solakoğlu, 2006).

Granüllü endoplazmik retikulum (GER)'daki poliribozomlarda kendisi için gerekli proteinlere ek olarak çeşitli plazma proteinlerini (albumin, protrombin, fibrinojen, ve lipoproteinler) de salgılar (Aytekin & Solakoğlu, 2006). Barbitüratlar gibi bazı ilaçların etkisizleştirilmesi için oksidasyon ve konjugasyon olayları düz endoplazmik retikulum (DER) 'da gerçekleştirilir (Dilek, 2003).

Hepatosit hücre kordonlarının aralarını dolduran, içerişi arteriyovenöz kan içeren özelleşmiş geniş çaplı kapiller olan sinüzoidler vardır. Sinüzoidlerin duvarını pencereci endotel hücreleri döşer. Bu endotel hücrelerinin sitoplazma ve organel sayıları azdır. Endotel hücrelerinin küçük, yassı ve koyu boyanmış nükleusları vardır. Sinüzoid ince bir retiküler lif kılıfıyla sarılıp desteklenmiştir. Komşu endotel hücreleri ile arasında çapları 0.2 µm çapında yarıklar vardır (Dilek, 2003; Aytekin ve Solakoğlu, 2006).

Endotel hücrelerinden başka sinüzoidleri döşeyen diğer bir hücre tipi Kupffer hücreleridir (Dilek, 2003). Değişime uğramış olan bu hücreler fagositik hücre olup monositlerden köken almaktadır (Demir, 2006). Karaciğer hücre topluluğunun %15'ini Kupffer hücreleri oluşturur (Aytekin ve Solakoğlu, 2006). Başlıca görevi dolaşımdaki zararlı ajanları ve ömrünü tamamlayan yaşlı eritrositleri ortadan kaldırmaktır. Ayrıca çeşitli sitokinleri de salgılamaktadır (Dilek, 2003).

Disse aralığında bulunan İto hücreleri perisinüzoidal hücre veya yağ depolayan hücre olarak da adlandırılırlar. İto hücreleri, farklı uzunlukta sitoplazmik çıkıntılara sahip yıldızlı hücrelerdir (Dilek, 2003). Bu hücrelerde A vitamininden zengin lipid çökeltileri bulunur (Aytekin & Solakoğlu, 2006).

2.1.3. Karaciğer Biyokimyası

Laktat dehidrogenaz, AST, ALT ve daha pek çok enzim hücresel enzimlerdir. Ekstrasellülere oranla hücresel enzim düzeyleri çok yüksek olduğu için plazma veya serum enzimatik aktivitesinde görülen en küçük artış hücresel hasarın duyarlı bir göstergesidir. Hücresel enzimler, plazma membranı sayesinde hücre içinde tutulmaktadır. Hücrenin metabolik aktif bir bölümü olan membranın bütünlüğünün korunması, hücrenin ATP üretimine bağımlıdır. ATP üretiminde eksikliğe yol açan olaylarda membran bütünlüğü korunamamaktadır. Hücrede okside olabilecek substratların azalmasına veya iskemi ve anokside olduğu gibi hücreye oksijen girişinin

engellendiği durumlarda olduğu gibi ATP üretimini negatif yönde etkileyen herhangi bir olayda hücre membranının hasara uğraması sonucu enzim açığa çıkış hızı artmaktadır. Enerji üretiminin yetersiz olduğu koşullarda membran yapısı bozulmakta ve membran yapısı enzimatik sızıntıya elverişli yapısal özellik kazanmaktadır (Onat, vd., 2006). Hasarlı karaciğer hücrelerinden ise AST diğer adıyla serum glutamat – okzalasetat transaminaz (SGOT) ve ALT diğer adıyla serum glutamat-piruvat transaminaz (SGPT) plazmaya salgılanır (Onat., vd., 2006).

AST, kalp ve iskelet kasını da içine alan birçok dokuya yayılmış halde bulunurken, ALT, primer olarak karaciğerde bulunur. AST'nin %80'ini karaciğerde bulunurken, ALT'nin tamamı mitokondri dışındadır (Dilek, 2003).

2.2. Karaciğer İskemi Reperfüzyonu

Organa giden kan akımının azalması ya da kesilmesi sonucunda organın oksijenden ve besinden yoksun kalması iskemi, organa giden kan akımının tekrar sağlanmasına ise reperfüzyon denir (Montalvo-Jane, 2008; Şener ve Yeğen, 2009). İskemik dokuda kan akımının tekrar başlamasının iki yararlı sonucu mevcuttur; birincisi enerji ihtiyacı karşılanmakta, ikincisi de toksik metabolitler ortamdaki uzaklaştırılmaktadır. Ancak toksik metabolitlerin sistemik dolaşıma dönmesinin metabolik asidoz, hiperkalemi gibi ciddi metabolik sonuçları olabilmekte ve reperfüzyon lokal doku hasarını arttırabilmektedir (Avatgil, 1997; Baykara B. , et al., 2009). İskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar (Şener ve Yeğen, 2009).

Dokuda her iskemi periyodu sonrasında reperfüzyon süreci gelişmeyebilir. No-reflow fenomeni olarak adlandırılan bu süreç tam mekanizması bilinmemekle birlikte

mikrovasküler yapının bozulması sorumlu tutulmaktadır (Montalvo-Jave, 2008; Mühürdaroğlu, 2009; Avatgil, 1997).

Porta Hepatis'in çapraz klemlenmesi ile hepatik arter ve portal venin oklüzyonu "pringle manevrası" olarak adlandırılır. Karaciğerin geniş yaralanmalarında onarma, karaciğer nakli hepatik rezeksiyon sırasında kanama kontrolü için yararlı bir manevradır (Baykara B., 2006; Bayramoğlu, 2010); ancak iskemi reperfüzyon hasarı kaçınılmazdır (Tata, et al., 2005). İskemi reperfüzyon (İR) sonrası doku hasarında SOR' ların etkili olduğunu belirten birçok çalışma vardır (Seo & Lee, 2002; Baykara B., et al., 2009; Sener, et al., 2003). En temel serbest oksijen radikalleri ise süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve peroksinitrit olarak genellenmiştir (Poussios, et al., 2003).

Karaciğer İR hasarı patofizyolojisi tam olarak anlaşılmış değildir (Akın, 2008). Kupffer hücre aktivasyonu, SOR oluşumu, sitokin ve kemokin salınımı, vazokonstriksiyon, nitrik oksit ve endotelin dengesindeki bozulma, nötrofil lökositlerin toplanması, mitokondri geçirgenliğinin değişikliğe uğraması ve pH paradoksu gibi çeşitli hücrel ve moleküler mekanizmalar rol oynar (Baykara ve Tekmen, 2005).

Hipoksinin ilk etkisi hücrenin aerobik solunumu yani mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon üzerinedir; oksijen basıncının azalması üzerine hücre içi ATP üretimi belirgin olarak azalır. Plazma membranının ATP enerjili sodyum pompasının aktivitesi azalır. Bunu sodyumun hücre içindeki birikimi ve potasyumun hücre dışına geçişi izler. Sodyum eriğinin net artışı, suyun izoosmatik artışı ile birlikte olup akut hücrel şişme oluşturur. ATP'de azalma ile birlikte fosfofruktokinaz enzimini uyaran adenzin monofosfatta artma nedeni ile anaerobik glikoliz artar. Glikojenden ATP üretimi ile hücrenin enerjisini temin etme amaçlı olan bu yolun uyarılması hızla glikojen depolarını tükenmesine yol açar. Artan glikoliz de fosfat esterlerinin hidrolizi ile laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olur böylece hücre içi pH azalır

(Kumar, et al., 2003). Bu oluşan metabolik asidoz hepatositlerde nekrotik hücre ölümünün başlamasına karşı koruyucu işlev görür. Ancak iskemik hücrelerde reperfüzyon ile birlikte pH'nın normale dönmesi latent pH bağımlı proteazları ve fosfolipazları aktive ederek hücre ölümüne neden olur. Bu fenomen "pH paradoksu" olarak adlandırılır. İskemik hücreler asidotik pH'da reperfüze edildiklerinde hücre ölümü durmaktadır. Benzer biçimde reperfüzyondan sonra intrasellüler pH artımı durdurulduğunda İR hasarına bağlı hepatosellüler nekroz engellenmektedir (Baykara ve Tekmen, 2005).

Kalsiyum İR içinde yer alan en önemli faktörlerden biridir (Montalvo-Jave, 2008). Sitoplazmik serbest kalsiyum normalde ATP-bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile hücre dışı kalsiyum veya canlılığını kaybeden hücre içi mitokondrial kalsiyum konsantrasyonundan 10.000 defa daha az konsantrasyonlarda sürdürülür. İskemi veya toksinler hücre dışı kalsiyumun plazma membranından içeri akışına yol açar ve bunu hücre içi stoklardan kalsiyumun serbest bırakılması izler. Artan sitoplazmik kalsiyum sırasıyla çeşitli fosfolipazları (membran hasarını iletir), proteazları (yapısal ve membran proteinlerini katabolize eder), ATPazları (ATP kaybını hızlandırır) ve endonükleazları (genetik materyali parçalar) aktive eder (Kumar, et al., 2003).

Yapılan çalışmalarda, iskemik dokunun reperfüzyonu sırasında, araşidonik asit son ürünlerinin (eikozanoidler) plazma konsantrasyonunda arttığı saptanmıştır. Eikozanoidler esas olarak Kupffer hücrelerinden salınırlar. Artan kalsiyum miktarı plazma membran fosfolipaz A₂ aktivasyonuna neden olur. Fosfolipaz A₂ hücre membran fosfolipidlerini araşidonik asite çevirerek, eikozanoid üretiminin tetiğini çeker (Astarcioglu, 1998). (Bkz. Şekil 2.3).

İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den AMP ve adenosin oluşur. Adenosin hızla hücre dışına diffüze 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 dehidrogenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik aside metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu (NAD^+)'dur (Şener ve Yeğen, 2009). İskemi sırasında hipoksantin birikimi reperfüzyon esnasında kan damarına tekrar oksijen girdiğinde KO tarafından O_2^- ve H_2O_2 üretiminde patlama meydana getirir. Pek çok vasküler yataktaki endotel hücreleri KO bakımından zengindir. KO'nun reperfüzyondan birkaç dakika sonra venüllerde ortaya çıkan ilk oksidan strese katkıda bulunduğu görünse de, yapışık lökositlerin bundan sonra meydana gelen çok daha büyük oksidan stresi açıkladığı görünmektedir (Teke, et al., 2008).

Aktive nötrofiller, SOR ve birkaç proteaz salgılayarak İR hasarına katkıda bulunurlar. Nötrofiller reperfüzyonun erken safhalarında toplanırlar ve epitel hücreleri ile adezyonu, epitel hücrelerinin membranında bulunan İntersellüler adezyon molekülü (ICAM) ile nötrofil membranında bulunan selektinler ve integrinlerin etkileşimi ile olur. İR, endotel hücrelerinden ICAM oluşumu artırır, bu da muhtemelen TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) ve IL-1 (Interleukin-1) sentezi ile ilgilidir (Montalvo-Jave, 2008). IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler ve TNF- α , karaciğer hasarı gelişmesinde erken mediatör olarak Kupffer hücrelerinden üretilir (Baykara ve Tekmen, 2005).

İ/R hasarı mekanizmalarından bir tanesi de reperfüzyon sırasında ET (endotelin) ve NO arasındaki dengenin bozulması ile ilgilidir (Montalvo-Jave, 2008). Endotelden salınan NOS ile sentezlenen NO, damarların gevşemesi, platelet agregasyonu ve nötrofil infiltrasyonunu engelleyerek travma sonrasında organlarda kan akımının sürdürülmesini sağlar (Kuyumcu, et al., 2004). Reperfüzyonun başlangıcında NO seviyesi azalırken, ET seviyesi artar. İskemi ile birlikte intrasellüler NADPH ve oksijen miktarları (NO sentezi için gerekli faktörler) azalır ve arginaz (L-arginin yıkan enzim) sentezi uyarılır (Montalvo-Jave, 2008). İskemi reperfüzyon modeli uygulanan

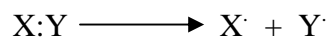
ratlara dışarıdan L-Arginin verilmesi İR hasarını azaltmış, L-NAME (NOS'un spesifik olmayan inhibitörü) verilmesi ise hücrel hasarı ve mikrodolaşımın bozulmasını şiddetlendirmiştir (Baykara ve Tekmen, 2005).

2.3. Serbest Radikaller

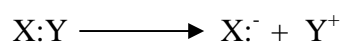
Dış yörüngesinde bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içeren, kısa ömürlü, kararsız kimyasal reaktiviteleri yüksek molekül veya atomlara serbest radikal denir (Akkuş, 1995; Mercan, 2004). Moleküldeki kararlılık, çevredeki moleküllerden bir elektron koparılarak elektron çifti oluşturulmasıyla yani oksidasyon ile sağlanır (Günaydın ve Çelebi, 2003).

2.3.1. Serbest radikallerin oluşması

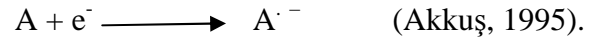
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalırlar. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi.



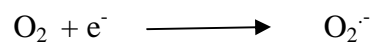
2.3.2. Serbest oksijen radikalleri (SOR) ve oksidatif stres

Belirli bir düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli bir düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa oksidatif stres hasarı oluşur (Çavdar, vd.,1997; Çakatay ve Kayalı, 2006).

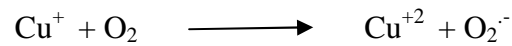
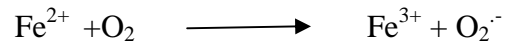
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşanlar olup (Akkuş,1995; Mercan 2004) bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

2.3.2.1. Süperoksit radikali (O_2^{-})

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikal anyonu meydana gelir (Akkuş, 1995; Mercan 2004).



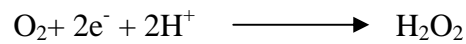
Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu $O_2^{\cdot-}$ meydana getirir (Akkuş, 1995).



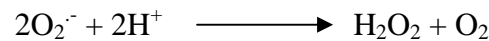
Belli koşullarda $O_2^{\cdot-}$ yapımı sekonder olarak artar ve hücrelerde toksik etki yapar. Bu durum en çok post-iskemik doku hasarında ortaya çıkmaktadır (Kozluca, 1993).

2.3.2.2. Hidrojen Peroksit Radikali (H_2O_2)

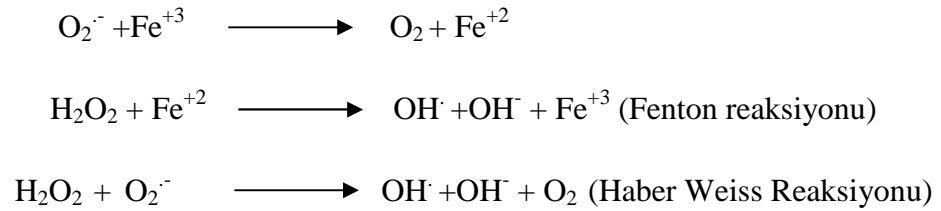
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya $O_2^{\cdot-}$ 'in bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek H_2O_2 ' i meydana getirir.



Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl üretimi, süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni (O_2) oluşturur. Bu reaksiyon ya kendiliğinden ya da SOD tarafından katalizlenir (Akkuş, 1995; Akın, 2008).



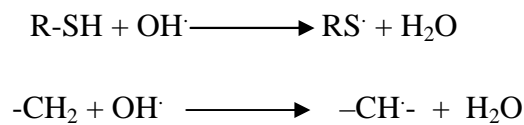
H₂O₂, membranları kolayca geçebilir. Kendisi bir serbest radikal olmayıp (Günaydın ve Çelebi, 2003) reaktif hidroksil radikalini oluşturduğu için önemlidir (Halliwell, et al., 2000).



2.3.2.3. Hidroksil Radikali (OH[·])

OH[·], Fenton Reaksiyonu ve Haber Weiss Reaksiyonu sonucu H₂O₂'den oluşmaktadır (Akkuş, 1995; Dökmeci, 2007; Bayramoğlu, 2010). Ayrıca suyun, yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da oluşur (Akın, 2008).

Serbest radikaller içinde OH en reaktif moleküldür ve diğer birçok moleküle reaksiyona girebilir (Günaydın ve Çelebi, 2003). Yarılanma ömrü çok kısadır (Şener ve Yeğen, 2009; Akkuş, 1995; Günaydın ve Çelebi, 2003). Bu yüzden oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına sebep olur (Akkuş, 1995).

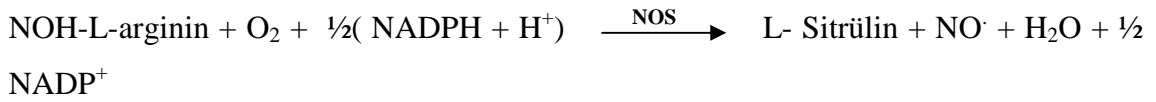


2.3.2.4. Singlet Oksijen (O_2)

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olur (Akkuş, 1995).

2.3.2.5. Nitrik Oksit (NO)

Reaktif nitrojen türüdür (Valko, et al., 2007; Günaydın ve Çelebi, 2003). NO Molekülünün yarı ömrü saniyeler düzeyindedir. Argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentezlenir. Sentez iki basamakta gerçekleşir (Yaykaşlı Okcu, 2006).



Eşlenmemiş elektronu nedeni ile bir serbest radikal türü olarak bazı memeli hücre tiplerince üretilen NO , damar tonusunun kontrolünde, platelet agregasyonunda, lökosit adezyonunda, hücre aracılı immün toksisitesinde, sinaptik geçirgenlikte sinyal molekülü olarak önem taşımaktadır (Demirtaş Yılmaz, 2009; Montalvo-Jave, et al., 2008; Günaydın ve Çelebi, 2003).

Fizyolojik erişimlerde üretilen NO , esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerinin durumunun aksine nitrik oksidi ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur (Şener ve Yeğen, 2009)

NO bazı durumlarda bir antioksidan gibi davranır ve lipid peroksidasyonundan korur (Halliwell, 1999). Bununla birlikte O_2^- bulunan ortamda O_2^- ile reaksiyona girer ve bir prooksidan olan peroksinitrit oluşur (Sarıçiçek, 2009).

2.3.3. Serbest Radikallerin Kaynakları

Mitokondrielerde oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada SOR oluşur. Çizelge 2.1'de SOR'i in vivo ortamda kaynakları görülmektedir (Çavdar, vd., 1997).

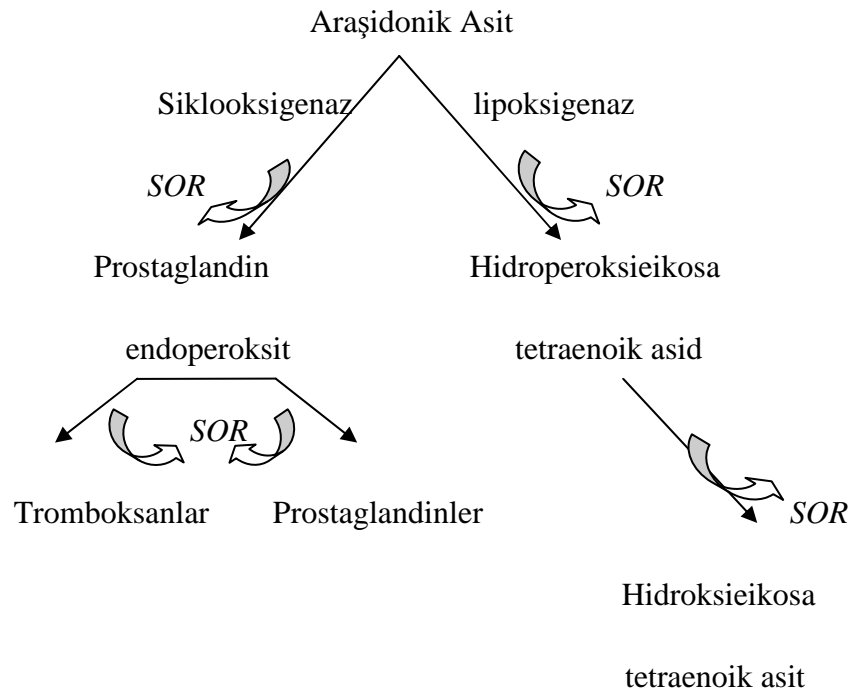
Hücrelerdeki en büyük serbest radikal kaynağı elektron transport zincirinden %2'lik elektron sızıntısıdır (Akkuş, 1995; Dökmeçi, 2007). İskemi sırasında mitokondrielerdeki oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenir ve elektron taşıma sistemindeki elektron kaçakları daha fazla olur (Çavdar, vd., 1997).

Bir diğer SOR kaynağı nötrofillerdir. Nötrofiller, plazma membranındaki nikotinamid dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimiyle süperoksit radikali oluşturarak fagosite mikroorganizmaların yok edilmesini sağlar (Günaydın ve Çelebi, 2003). Ayrıca nötrofiller tarafından, myeloperoksidaz enzimi aracılığı ile oluşturulan hipoklorik asit de bir SOR'dur (Çavdar, vd., 1997).

Çizelge 2.1. Serbest Oksijen Radikalleri Kaynakları

<p>I-Normal biyolojik işlemler</p>	<p>1- Oksijenli solunum 2- Katabolik ve anabolik işlemler</p>
<p>II- Oksidatif Stres Yapıcı Durumlar</p>	<p>1- İskemi-Hemoraji-travma-radyoaktivite-intoksikasyon 2- Ksenobiyotik maddelerin etkisi a) İn hale edilenler b) Alışkanlık yapan maddeler c) İlaçlar 3- Oksidan Enzimler a) ksantin oksidaz b) İndolamin dioksigenaz c) Triptofan dioksigenaz d) Galaktozoksidaz e) Siklooksigenaz f) Lipooksigenaz g) Monoamino oksidaz 4- Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu 5- Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler) 6- Uzun süreli metabolik hastalıklar 7- Diğer nedenler: sıcak şoku, güneş ışını, sigara</p>
<p>III-Yaşlanma Süreci</p>	

Araşidonik asit metabolizması da reaktif oksijen metabolitlerinin önemli bir kaynağıdır (Bkz. Şekil 2.3). Fosfolipaz ve protein kinaz aktivasyonu ile plazma membranından araşidonik asit salınımı artar (Akkuş, 1995).



Şekil 2.3. Araşidonik Asit Metabolizması

Oksidan enzimler aracılığı ile de serbest radikaller oluşur (Çavdar vd., 1997). Bunlardan bir tanesi de ksantin oksidazdır ve karaciğer iskemi reperfüzyon patofizyolojisinde önemlidir (Şener ve Yeğen, 2009).

2.3.4. Serbest radikallerin etkileri

Serbest radikallerden etkilenebilecek önemli vücut yapıları arasında proteinler (enzimler, kollagen), nörotransmitterler, nükleik asitleri, membrandaki yağ asitleri, karbonhidratlar vardır (Kozluca, 1993; Ardite, et al., 1999).

Hücre membranı poliansatüre yağ asitince (PUFA) zengindir (Günaydın ve Çelebi, 2003). PUFA'nın oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Kendi kendine devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler (Akkuş,1995). Reaksiyon zinciri poliansatüre yağ asitindeki karbon atomundan 1 hidrojen atomu koparan hidroksil radikali gibi güçlü bir oksidanla başlar. Böylece oluşan karbon merkezli radikal, komşu yağ asitinden hidrojen atomu koparan oksijen merkezli peroksil radikaline dönüşür. Bu reaksiyon yağ asitleri tükeninceye kadar devam eder (Günaydın ve Çelebi, 2003).

SOR, DNA ile kovalent bağlanmak suretiyle DNA'da hasara sebep olur. Bunun sonucunda da onkogen aktivasyonuna yol açar ve kanserle ilgisi olduğu da düşünülmektedir. Ayrıca yaşlanmada cilt kırışıklıkları, böbrek fonksiyonunda azalma ve immun hastalıklara yatkınlığın artması gibi durumlarda da serbest radikallerin neden olduğu bildirilmektedir (Kozluca, 1993). Çeşitli dokulardaki hastalıkları (parkinson, ateroskleroz, romatoid artrit, katarakt vb.), iskemi-reperfüzyon hasarı, alkol, radyasyon hasarı da SOR ile ilişkilidir (Çavdar, vd., 1997).

2.4. Antioksidanlar

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddeleri oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir (Çavdar, vd., 1997). Antioksidanlar doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılır (Akkuş, 1995).

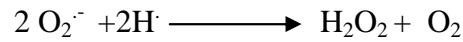
2.4.1. Endojen (doğal) antioksidanlar

Günlük yaşamın rutin ilerleyişı sırasında karşılaşılan oksidatif stres faktörlerinin giderilmesi ve fizyolojik işleyişin devamında endojen olarak bilinen antioksidanlar önemlidir. Hücrenel antioksidan enzimler ve enzim olmayan antioksidanlardan oluşan endojen antioksidanlar ve özellikleri Çizelge 2.2' de verilmiştir (Dünder & Aslan, 2000).

İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar SOD, CAT ve Gpx enzimleridir (Çavdar, vd., 1997).

2.4.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD, $O_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizler ve OH^{\cdot} Radikali oluşturmak için ortamda H_2O_2 ile reaksiyona girecek $O_2^{\cdot-}$ radikalini ortadan kaldırır (Günaydın ve Çelebi,2003).



İnsan hücrelerinde özellikle sitozolde bulunan bakır ve çinko iyonu içeren SOD ile manganez iyonu içeren mitokondrial SOD olmak üzere SOD'un iki izoenzimi bulunur (Çavdar, vd., 1997).

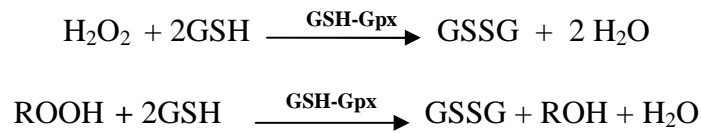
Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Akkuş, 1995). SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intrasellular öldürülmesinde de rol oynar (Akın,2008).

Çizelge 2.2. Bilinen endojen antioksidanlar ve etkiler

<i>Antioksidanlar</i>	<i>Yapısı</i>	<i>Yerleşimi</i>	<i>İşlevi</i>
Stokrom Oksidaz	Tetramerik Protein	Plazma	Süperoksit nötröllizanı
SOD	CuZn, Mn SOD	Mitokondri, Serum	$O_2^{\cdot -}$ radikalini H_2O_2 'e çevirir
Katalaz	Hemoprotein	Peroksizomlarda	Peroksit nötröllizanı
GSH- P_x	Selenoprotein	Sitosol, mitokondri	Lipid peroksidasyonu ürünlerini indirger
GSH-redüktaz	Dimerik protein	Sitosol, mitokondri	Disülfiteri indirger
a-tokoferol	Yağda çözünen vitamin	Membranlar, ekstrasellular ortam	Peroksidasyonu azaltır
B-karoten	Vit.A prekürsörü	Hücre membranları	Peroksil temizleyici
Glutasyon	Tripeptid	İntrasellular ortam, alveoller	GSH redoks substratı
Askorbik asit	Suda çözünen vitamin	Hücre içi ve dışı sıvıları	Vitamin E'yi rejenere eder
Ürik asit	Okside pürin bazı	Geniş bir dağılım gösterir	Hidroksil toplar, vitamin C'yi korur.
Sistein	Aminoasit	Geniş bir dağılım gösterir	Organik bileşikleri indirger
Albumin	Protein	Plazma, serum	Serbest radikalleri giderir
Bilirubin	Hemoprotein ürünü	Dolaşım kanı, dokular	Zincir kırıcı antioksidan
Seruloplazmin	Protein	Dolaşım kanı dokular	$O_2^{\cdot -}$ radikalini H_2O_2 'e çevirir
Transferin	Glikoprotein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Laktoferrin	Protein	Plazma	Demir iyonlarını bağlar
Ferritin	Glikoprotein	Dolaşım kanı, dokular	Doku demiri bağlayıcısı

2.4.1.2. Glutatyon peroksidaz (Gpx)

Glutatyon peroksidaz, sitoplazmada bulunan, dört selenyum atomu içeren tetramerik bir enzimdir (Akın, 2008). Gpx, hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir (Akkuş,1995) ve H₂O₂'ye karşı en belirgin savunma sistemi olduğu düşünülmektedir (Demirtaş Yılmaz, 2009; Çavdar, vd., 1997). Kofaktör olarak glutatyonu (GSH) kullanmaktadır (Akkuş, 1995).



İnsanlarda Gpx'in 4 farklı izoenzimi bulunmuştur. Gpx- 1 en sık bulunandır. H₂O₂'nin etkili bir yok edicisidir. Gpx-4 daha az bulunur; ancak lipid hidroperoksidlerine karşı daha aktiftir (Akın, 2008). Bu enzim en çok karaciğer ve eritrositte bulunmaktadır (Demirtaş Yılmaz, 2009).

2.4.1.3. Katalaz (CAT)

Peroksizomlarda lokalize, dört tane hem grubu bulunan hemoproteindir. H₂O₂'i oksijen ve suya parçalar (Onat, vd., 2006; Akkuş, 1995).



CAT'ın indirgeyici aktivitesi H₂O₂, metil etil hidroperoksidleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksidlerine karşı ise etki etmez (Akkuş,1995).

Kan, kemik iliği, müköz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (Onat, vd., 2006).

2.4.2. Eksojen antioksidanlar

Akut fiziksel aktiviteler ve gebelik gibi fizyolojik durumlar ile pek çok patolojide lokal ve genel antioksidan mekanizma aşılabilmekte ve antioksidan savunma sistemi yetersiz kalmaktadır. Bu gelişmeler karşısında antioksidan kapasitenin güçlendirilmesi amacıyla, birçoğu Çizelge 2.3' de gösterilen, eksojen antioksidan maddelerin alımı gündeme gelmiştir (Dündar & Aslan, 2000).

2.4.3. Antioksidanların etki etme şekilleri

1. Toplayıcı Etki (Scavenging Etki): Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler bu tip bir etki gösterir.

2. Bastırıcı Etki (Quencher Etki): Serbest oksijen radikalleri ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptir.

3. Zincir Kırıcı Etki (Chain Breaking Etki): Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobun, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4. Onarma Etkisi (Repair Etki): Oksidatif hasar görmüş biyomolekölü onarırlar (Akkuş, 1995; Gökpınar, vd., 2006).

Çizelge 2.3. Başlıca eksojen (farmakolojik) antioksidanlar ve özellikleri.

Antioksidan Sınıfı	Spesifik Tipi	İşlevi
Ksantin oksidaz inhibitörleri	Allopurinol Oksipurinol Pterin aldehit Tungsten	Ksantin oksidaz reaksiyonunda süperoksit üretimini inhibe eder
Proteaz inhibitörleri	Soya Tripsin İnhibitörü Serin protea İnhibitörleri Fenilmetilsülfonil	Ksantin dehidrogenaz oksidaz oluşumunu bloke eder
NADPH oksidaz inhibitörleri	Adenozin Lokal anestezipler Kalsiyum kanal blokerleri Nonsteroid antiinflatuar -Cetiedil	Makrofajlarda NADPH oksidaz ile süperoksit oluşumunu önler
Süperoksit dismutaz	Doğal SOD IgA bağımlı SOD Polietilen glikol SOD	Süperoksitten hidrojenperoksit dismutasyonunu katalizler
	Ginkgo Biloba (Egb 761)	SOD ile benzer fonksiyon
Katalazlar	Doğal katalaz PEG-katalaz	H ₂ O ₂ ' nin oksijen ve suya indirgenmesi ve nötralizasyonu
	Lipzom kapsüllü katalaz	H ₂ O ₂ ' i O ₂ ve H ₂ O'ya çevirir.
Nonenzimatik toplayıcılar	Mannitol	Hidroksil radikal giderici
	Albumin	Geniş çaplı oksidan toplayıcı
	Dimetil sülfoksit	Fe, süperoksit, hidroksil toplayıcı
	17-aminosteroid lazaroidler	H ₂ O ₂ ve hidroksil giderici
	Glutasyon	Süperoksit giderici
	Ürik asit	Süperoksit ve hidroksil giderici
	Spin tuzakları	Tüm radikalleri toplar
	Bilirubin	Peroksidasyon zincirini bozar
Demir redoks zinciri inhibitörleri	Deferoksamin Apotransferrin Seruloplazmin	Serbest Fe ⁺³ atomlarını bağlayarak radikal reaksiyonlarını önler
	Antinötrofil serumu	Hücrel glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini artırır
	Monoklnal antibodiler	Nötrofillerin endotele adezyonunu inhibe eder

2.5. Fenolik Maddeler

Serbest radikaller vücutta çeşitli aktiviteler sonucunda oluşabilir. Serbest radikallerin oluşturacağı doku hasarına karşı vücudun kendi savunma mekanizması (SOD, CAT, Gpx) vardır (Yılmaz & Toledo, 2004). Antioksidan savunma mekanizması ile serbest radikaller arasındaki denge bozulursa oksidatif stres oluşur (Morton, et al., 2000). Bunun sonucunda da biyolojik öneme sahip makromoleküller zarar görmekte ve biyolojik hastalıklar oluşmaktadır. Serbest radikallerin neden olduğu bu hasarı önlemek için beslenme ile diyetel antioksidan alımı ve antioksidan enzim savunma sisteminin desteklenmesi sağlık yönünden önemlidir (Erbaş, vd., 2008).

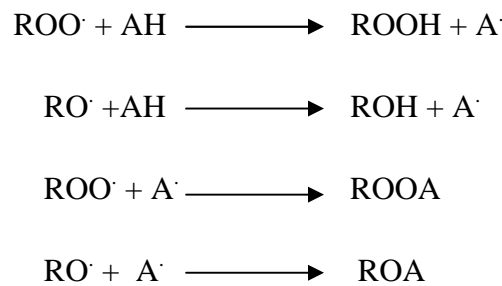
Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir (Tunalier, vd., 2002).

Bir hidroksil grubunu içeren aromatik bir halkaya sahip geniş bir madde grubuna fenolik bileşikler denilmektedir (Kefeli, et al., 2003) ve bunlar bitkilerin ikincil metabolitleridir (Labieniec ve Gabryelak, 2006). Bitkilerde fenolik maddeler ya vakuollerde birikirler (Kefeli, et al., 2003) ya da bitki hücre duvarlarında lignin ile polimerize halde bulunurlar (Morton, et al., 2000).

Özellikle meyve sebzelerin rengi, lezzeti ve dayanıklılığı üzerine etkili olan fenolik maddeler, antioksidan özelliklerine bağlı olarak antikanserojen, antimutajen, antiinflammatuar özellik gösterir (Yıldız ve Baysal, 2003; Galati and O'Brien, 2004). Bunların besinlerde bulunan ve kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korudukları bilinmektedir (Tunalier, vd., 2002). Gıda sanayi yanında farmakolojide de kullanım alanı oldukça geniştir. İlaç sanayisinde fenolik maddelerin özellikle

antimikrobial özelliklerinden yararlanılmaktadır. Ödem giderici ve antialerjik etki de gösterirler (Yıldız ve Baysal, 2003).

Flavonoidler ve fenolik asitler çeşitli yollarla “indirgeyici ajan olarak, hidrojen verici olarak” (Başer, 2002) antioksidan gibi davranır. Bunların içinde belki de en önemlisi serbest radikalleri etkileyerek serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırmasıdır. Bunu da lipid radikallere, hızla H⁺ vermesi şeklinde yapar. Görevi lipid peroksi (ROO[·]) ve alkoksil (RO[·]) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. Son radikal stabil olmak zorundadır veya zincir reaksiyonu ile hızlı bir reaksiyona maruz kalmak zorundadır aksi halde zincir reaksiyonları yayılır. Bu stabilizasyon ise molekül içindeki hidrojen bağlarının yeniden şekil alması ile sağlanır. Fenolik antioksidanlar mükemmel H⁺ ve e⁻ donörleridir (Morton, et al., 2000; Burak ve Çimen, 1999).



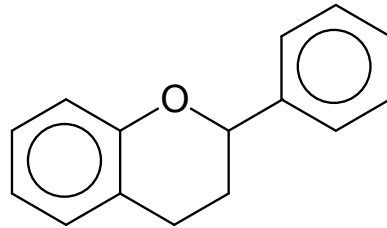
(Burak & Çimen, 1999).

Polifenoller, fenolik asitler ve flavonoidler şeklinde ikiye ayrılır (Yılmaz, 2010). Ancak flavonoidler ve fenolik asitler birbirinden ayrı düşünülemez. Çünkü bu bileşikler genelde birlikte bulunurlar (Ekbül, 2004).

2.5.1. Flavonoidler

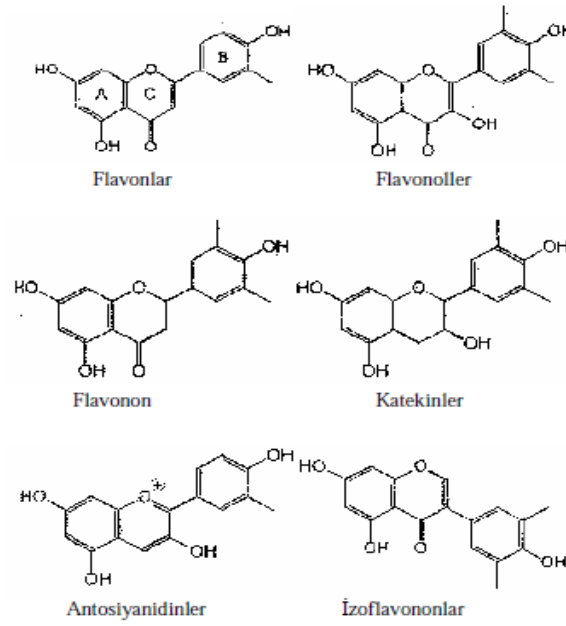
Flavonoidler oksijen içeren bir piren halkasına bağlı benzen halkasından oluşmaktadır (Bkz. Şekil 2.4). 4000'in üzerinde doğal kaynaklı flavonoid tanımlanmıştır.

Flavonoidler, glikozidler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarlar, sıcak asit ve enzimlerle sırasıyla aglikon ve şekere parçalanabilirler (Burak & Çimen, 1999). Flavonoidler yaygın olarak sebze, meyve çay ve şarapta bulunurlar ve bitkileri radyasyondan, böceklerden ve otçul memelilerden korurlar. Antioksidan özellikleri sayesinde dokuları serbest radikal saldırılarına karşı lipid peroksidasyonuna karşı korurlar (Yılmaz & Toledo, 2004).



Şekil 2.4. Flavonoidlerin temel yapısı

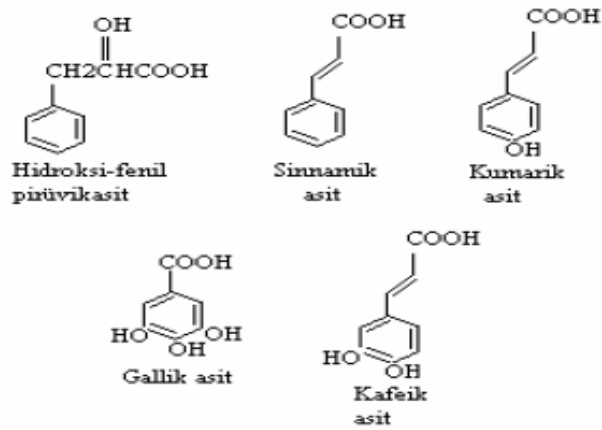
Flavonoidler piren halkasındaki varyasyonlara bağlı olarak Flavonoller, flavonlar, katekinler, antosiyanidinler, antosiyanidler olarak ayrılırlar (Şekil 2.5) (Ekbul, 2004).



Şekil 2.5. Flavonoid alt sınıfları

2.5.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler, bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan ve yapılarında bir veya daha fazla hidroksil yapılı aromatik halka bulunduran bileşiklerdir (Bkz. Şekil 2.6) (Ekbul, 2004).

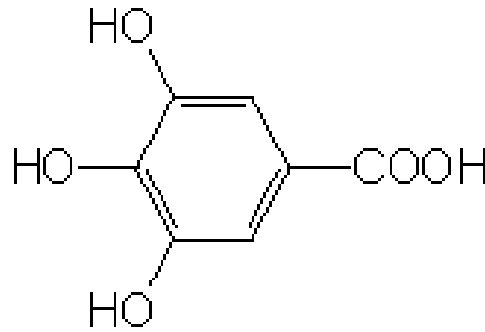


Şekil 2.6. Bitkisel kaynaklı bazı fenolik asit çeşitleri

Flavonoidlerin öncü maddesi olan hidroksinamik (kafeik, kumarik, ferulik ve sinapik asit), hidroksikumarin (skopoletin), ve hidroksibenzoik (elajik, gallik vanillik asitler) asitler gibi fenolik asitler metallerle bileşik oluşturabilirler (Yılmaz & Toledo, 2004).

2.5.2.1. Gallik asit

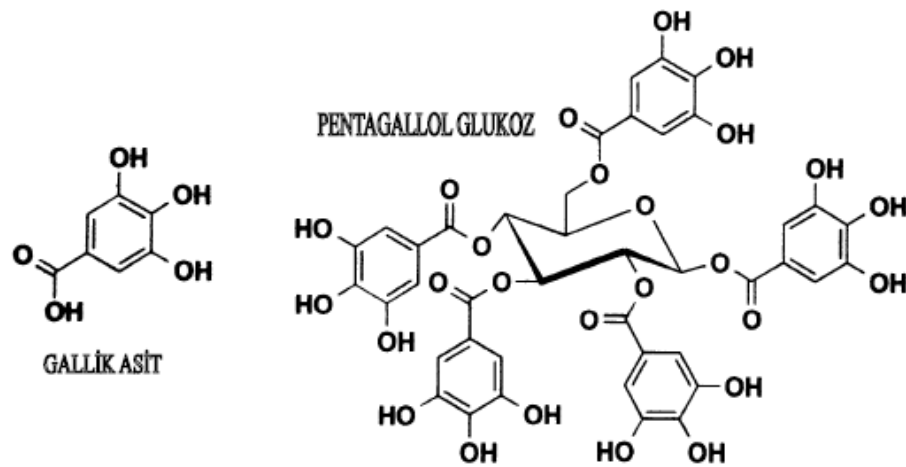
Gallik asit (3, 4, 5- trihidroksibenzoik Asit) bitkilerde doğal olarak üretilen bir polifenoldür (Bkz. Şekil 2.7) (Stanely, et al., 2009). İnsan diyetindeki zengin bitki fenolik maddesidir ve hastalıkların riskini azalttığı bilinir (Hsu & Yen, 2007)



Şekil 2.7. Gallik asitin Yapısı (3,4,5- trihidroksibenzoik Asit) (Stanely, et al., 2009)

Gallik asit, bitkisel gıdalarda, birada (Sarıkaya, 2005), kırmızı şarapta (Niu, et al., 2004; Kim, et al., 2009; Stanely, et al., 2009), yeşil çayda (Stanely, et al., 2009; Niu, et al., 2004) narda bulunur. En önemli kaynağı çaydır (Gupta, et al., 2007). Ayrıca meşe ağaçlarından, kestane ve üzümünden elde edilmiştir (Stanley, et al., 2009). Scheele adlı araştırmacı 1786 yılında meşe palamudunda gallik asit varlığını göstermiştir (Sarıkaya, 2005).

Yurdumuzun hemen her yöresinde yetişen meşe (*Quercus*) türleri ile bunların ürünleri olan palamut ve mazi, pirogallik tanen bakımından zengin droglardır. Hidrolizleri sonucu gallik asit oluşur (Üstün & Aydın, 2007). Basit tipik bir gallotanen molekülünün merkezinde bir şeker molekülü ve şekerle ester bağı yapmış gallik asit halkalarından oluşur (Bkz. Şekil 2.8) (Sarıkaya, 2005; Belmares, et al., 2004).



Şekil 2.8. Hidrolize olabilen tanenlerden gallotanen ve gallik asit

En önemli uygulama alanlarından biri farmasotik sanayinde sülfanamidlerle beraber kullanılan antibakteriyel bir ajan olan trimetoprim üretiminde kullanılmaktadır. Bunun yanında antioksidan bir ajan olarak kullanılan propil gallat gibi gallik asit esterlerinin üretiminde, deri kozmetik ve fotoğraf boyalarında kullanılan priggallol bileşiklerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır (Sarıkaya, 2005; Belmares, et al., 2004). Ayrıca yiyeceklerin bozulmasını önlemek için yiyeceklerin içerisinde kullanılır (Pasaphan and Chirachanchai, 2008; Yoshino, et al., 2002).

Gallik asit güçlü, doğal bir antioksidandır. Yapılan çalışmalarda gallik asitin süperoksit, hidroksil (Stanely, 2009) nitrik oksit, peroksinitrit ve nitroksil (Yılmaz & Toledo, 2004) radikallerini etkisiz hale getirdiği rapor edilmiştir.

3. MATERYAL METOD

Deneyisel çalışmamızın tamamı; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Deney Hayvanları, Moleküler Biyoloji ve Toksikoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 180/2010 sayılı izni ile yapılmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Deneyisel çalışmamızda 200-250 gram ağırlıkta sağlıklı, 3-4 aylık, *Sprague-dawley* cinsi, albino dişi sıçanlar kullanıldı. Tüm deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarından temin edilerek deneyde kullanıldı. Deney hayvanlarının 1 hafta süre ile adaptasyonları sağlandı. Deney hayvanları deney süresince 12; 12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısı (22 ± 2 °C) ve nemi (%45- 50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldı. Deney sürecinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi.

3.2. Deney Grupları

Toplam 28 tane deney havanı arasından rastgele seçimle her birinde n=7 sıçan olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu.

Grup I (Sham Grubu): Bu gruptaki hayvanlara 1 ml serum fizyolojik oral yolla verildi. Median laparotomi yapılarak hepatik arter portal ven ve safra kanalları çevre dokulardan ayrıldı. Başka hiçbir işlem yapılmadan geri kapatıldı. 105 dk bitiminde eter anestezisi altında diseksiyonları gerçekleştirildi.

Grup II (İR + Serum Fizyolojik): bu gruptaki deney hayvanlarına 1ml serum fizyolojik oral yolla 7 gün boyunca günde 1 kez olmak üzere verildi. 8. Gün 45 dk iskeminin ardından 60 dk reperfüzyon yapılarak eter anestezisi altında diseksiyonları gerçekleştirildi.

Grup III (İR + 50 mg/kg Gallik Asit): Bu gruptaki her bir deney hayvanı için 1ml serum fizyolojikte 50 mg/kg gallik asit çözdürülerek oral yolla 7 gün boyunca günde 1 kez olmak üzere verildi. 45 dk iskeminin ardından 60 dk reperfüzyon yapılarak eter anestezisi altında diseksiyonları gerçekleştirildi.

Grup IV (İR + 100 mg/kg Gallik Asit): Bu gruptaki her bir deney hayvanı için 1ml serum fizyolojikte 100 mg/kg gallik asit çözdürülerek oral yolla 7 gün boyunca günde 1 kez olmak üzere verildi. 45 dk iskeminin ardından 60 dk reperfüzyon yapılarak eter anestezisi altında diseksiyonu gerçekleştirildi.

3.3. Gallik Asit Uygulaması

Deneyde III. ve IV. gruplara oral yolla verilen gallik asit Sigma' dan temin edildi (Katalog no: G7384-100). Gallik Asit verilecek doza göre her bir deney hayvanı için 1 mL %0,9'luk steril serum fizyolojik içerisinde çözülerek, 7 gün boyunca günde 1 kez olmak üzere, günlük ve taze olarak, gavaj yolu ile verildi.

3.4. Cerrahi İşlemler

Deneyisel iskemi reperfüzyon modelinde kullanılacak olan tüm hayvanlar deneyin bir gece öncesinden aç bırakıldı (Araya, et al., 2003). Tüm cerrahi işlemler diurnal hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkileri dikkate alınarak 09.00-12.00 saatleri arasında yapıldı (Watanabe, et al., 2001).

İR yapılacak hayvanların anestezisi 10 mg/kg ksilazin ve 70 mg/kg ketamin karışımının kas içine enjeksiyonu ile sağlandı (Aydoğdu, et al., 2005). Her bir deney hayvanı, ılık ve sabit sıcaklıkta olan diseksiyon tablasına sırt üstü pozisyonda tespit edildi ve rektal ısı kontrolü yapıldı (Stangl, et al., 2009) Cerrahi uygulama bölgesinin %70'lik etil alkol ile temizliği sağlandı. Steril şartlar altında median laparotomi uygulandı.

Tüm gruplarda önce hepatik arter, portal ven, safra kanalı görünür hale getirildi. Sham grubunda başka bir işlem gerçekleştirilmeden kapatıldı. II, III, IV. Gruplarda bulunan deney hayvanlarına, antitratmatik vaskular klemp yardımıyla, 45 dk süre ile kan akışı durdurularak iskemi gerçekleştirildi. Reperfüzyon süresince kaybolan sıvının hipovolemik etkilerini önlemek için karın boşluğuna 0,5 ml steril serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi (Sener, et al., 2003). Bu işlemi takiben kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kesi bölgesi kapatıldı. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı, kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak 60 dakikalık reperfüzyon süresi boyunca yaşatıldı.

3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Deney gruplarına ait hayvanlar hafif eter anestezisi altında intrakardiyak olarak kalpten bütün kanın alınması ile yaşamları sonlandırılmıştır.

Kan örnekleri MSE Mistral 2000 marka cihaz ile 10 dk 3000 rpm devirde santrifüjlenerek serumları elde edildi. Ependorf tüplere aktarılan serum örnekleri biyokimyasal ALT ve AST miktar analizleri için -80 °C derin dondurucuda korundu. ALT ve AST değerleri ticari kit (Biolabo, Maizy, France) kullanılarak Crony Airone 200 RA otoanalizatör ile belirlendi.

Tüm hayvanlardan intrakardiyak kanın alınmasını takiben, karaciğerleri çıkarıldı serum fizyolojik ile hızlı bir şekilde yıkandı. Sol lobun bir kısmı histopatolojik teşhisler için %10'luk nötral formalin tespit çözeltisine, median lob ise biyokimyasal analizler için -80 °C derin dondurucuda koruma altına alındı.

Karaciğer İR sitotoksitesini aydınlatmak için deney gruplarımızdaki sıçanlardan karaciğer doku örneklerinin homojenizasyonu yapıldı CAT ve Gpx enzim aktivitelerine bakıldı. Homojenizasyonu için; -80 °C'den çıkarılan karaciğer dokusundan küçük bir parça alınarak hassas terazide tartıldı ve KCl çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C 5000 G'de 1 saat santrifüj (Ependorff Centrifuge marka ve 5804 R model) edildi. Süpernatant kısmı elektroforez için ayrıldı.

Doğal Jel Elektroforezi kullanılarak aktiviteleri belirlenecek olan CAT ve Gpx izoenzimlerinin total protein miktarları belirlendi. Çalışmamızda kullandığımız Lowry yöntemi fosfomolibdotungstik asit çözeltisinin (folin-ciocalteau belirteci) tirozin bakiyeleri ile reaksiyona girerek mavi bir renk oluşturması esasına dayanır. Reaksiyon bakır ile protein arasında kompleks oluşumuyla başlar; alkali çözeltide, oda sıcaklığında 5-10 dk içinde tamamlanır. Folin belirtecindeki molibden ve tungsten ile birleşerek yeni bir kompleks ortaya koyan bakır ile yöntemin duyarlılığı 3-15 kat artırıldı. Bu yöntemin uygulanabilmesi için, 6 mL reaksiyon karışımında 10-100 µg protein bulunmalıdır. Bu sınırlara göre, 6 mL reaksiyon ortamına katılacak olan 0,5 mL örneğin 10-200 µg protein içermesi gerekir.

Karaciğer doku örneği homojenatlarında Doğal (Native) Jel Elektroforez tekniğiyle Scie-Plas marka mini vertical Electrofophoresis ünitesi kullanılarak CAT ve Gpx izoenzimlerinin jelde yürümesi sağlandı ve substrat ile tepkimelerine göre aktivitesi belirlendi (Jayakumar, et al., 2007).

3.5.1. Doğal jel elektroforezi

3.5.1.1. Çözeltiler

Tüm çözeltiler deiyonize saf su ile hazırlandı. Tris içeren tamponlar 'trizma base' ile hazırlandı ve pH'ları HCl ile ayarlandı.

- A)** Alt tank tamponu (63 mM Tris, 0.05 N HCl, pH 7.5)
 Tris.....22.7 g
 1N HCl.....150ml
 H₂O.....3 litreye tamamlandı.
- B)** Üst tank tamponu (37.6 mM Tris, 40 mM glisin, pH 8.9)
 Tris.....4.56 g
 Glisin.....3 g
 H₂O.....1 litreye tamamlandı.
- C)** 4 X ayırma jeli tamponu (947 mM Tris, 0.289 N HCl, pH 8.5)
 Tris.....11.47
 1 N HCl.....28.92 ml
 H₂O.....100 ml'ye tamamlandı.
- D)** 4 X yükleme jeli tamponu (158 mM Tris, 0.256N H₃PO₄, pH 6.9)
 Tris.....1.92 g
 1N H₃PO₄25.6 ml
 H₂O.....100 ml'ye tamamlandı.
- E)** Ayırma jeli için monomer çözeltisi (%40 T, % 5 C_{bis})
 Akrilamid.....38 g
 Bis.....2 g
 H₂O.....100 ml'ye tamamlandı.

F) Yükleme jeli için monomer çözeltisi (%6.25 T, %20 C_{bis})

Akrilamid.....5 g
 Bis.....1.25 g
 H₂O.....100 ml'ye tamamlandı.

G) Polimerizasyon başlatıcı (%0.06 amonyum persülfat, %0.002 riboflavin fosfat)

%10 Amonyum Persülfat(AP).....0.6 ml
 % 0.02 Riboflavin fosfat.....10 ml
 H₂O.....100 ml'ye tamamlandı.

H) Sukroz-boya Çözeltisi [% 50 sukroz, % 0.1 bromofenol mavisi(bromophenol blue)]

Sukroz.....5 g
 % 1 Bromofenol mavisi.....1 ml
 H₂O.....100 ml'ye tamamlandı.

Ayrırma jeli hazırlanırken, monomer (akrilamid) ve çapraz bağlayıcı (bis) yüzdelere hesaplanan %T ve % C_{bis} oranları göz önünde bulundurularak monomer, tampon, TEMED ve su 50 ml'lik bir erleninde karıştırıldı. Polimerizasyon başlatıcı (G çözeltisi) eklenip hafifçe çalkalandı ve elektroforez aletinin jel dökme aparatına, çeşitli kalınlık ve boyutta hazırlanabilmesine olanak sağlayan, iki cam (jel kaseti) arasına Pasteur pipeti yardımı ile döküldü. Jelin yüzeyini düzleştirme için butanol çözeltisi döküldü. Polimerizasyondan sonra butanol çözeltisi dökülerek birkaç kez distile su ile yıkandı.

Yükleme jeli hazırlanırken, monomer, tampon ve TEMED bir erleninde karıştırıldı ve polimerizasyon başlatıcı eklendi. Ayrırma jelinin üzerine 0.3 ml olacak şekilde yükleme jeli ile dolduruldu. Örnek uygulama ceplerinin oluşumunu sağlayan tarak, hava boşluğu kalmayacak şekilde, yükleme jelinin içine yerleştirildi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı. 10 hacim örnek ile 1 hacim sukroz-boya çözeltisi karıştırıldı. Örnekler ve standart karışım her bir kuyucukta 15-100µg protein olacak

şekilde mikropipet yardımı ile jel yüzeyine uygulandı. Jel kasetleri tanka yerleştirildi ve jel kasetlerinin altta kalan kısmına 2.5 litre alt tank tamponu eklendi. Jel kasetlerinin bulunduğu üst bölme ise üst tank tamponu ile dolduruldu. Anot ve katot bağlantıları takıldı ve sistem çalıştırıldı. İzleme boyası bromofenol mavisinden kaynaklanan mavi bant, jelin altına 0.5 cm kalana dek yürüdükten sonra işlem durduruldu. Saptama yöntemleri kullanılarak analiz tamamlandı (Temizkan & Arda, 2004).

CAT aktivitesinin belirlenmesi Woodbury ve arkadaşlarının (1971) metoduna göre yapıldı. Proteinleri yürüttüğümüz %8'lik jel 5mM H₂O₂ solüsyonunda 10 dakika bekletilip yıkandıktan sonra %1'lik potasyum ferrik siyanid ve %1'lik ferik kloritten oluşan reaksiyon karışımına koyuldu, jel boyanana kadar bekledi. Koyu yeşil zeminde CAT aktivitesi gösteren protein bantları beyaz renkte boyandı.

Gpx izoenzim aktivitesini ölçmek için Lin ve arkadaşlarının (2002) metodu kullanıldı. Proteinleri yürüttüğümüz jel, içinde 200 mg glutatyon ve %30 H₂O₂ 50mL 50 mM Tris HCl buffer (pH:8) karışımlı çözeltide 30 dakika bekletildikten sonra, içerisinde 25 mg NTB ve 25 mg PMS bulunan 50 mL 50 mM tris-HCl buffer (pH:8) bulunan çözeltiye aktarıldı. Gpx izoenzim aktivitesinin olduğunu gösteren beyaz renkte bandlar gözlenmeye çalışıldı.

Tüm deney grubu hayvanlarının karaciğer dokularına ait olan CAT ve Gpx enzim aktiviteleri sonucu jelde ortaya çıkan bandlar Kodak Gel Logic 1500 Imaging System Jel görüntüleme sisteminde Kodak Molecular Imaging Software paket programı kullanılarak fotoğraflandırıldı. Jel üzerinde enzim aktiviteleri sonucu oluşan bölgelerin alanları deney grupları arasında karşılaştırmalar yapılmak üzere sayısal olarak ölçüldü.

3.5.2.2. Karaciğer doku örneklerinin histolojik analizleri

Deney hayvanlarının diseksiyonu sırasında histolojik incelemeler için alınan karaciğer dokularının her biri doku takip kaseti içerisinde %10 tamponlanmış formaldehit solüsyonunda 24 saat süre ile bekletildi. Tespit işlemi sonrasında rutin histolojik takip metodu kullanılarak parafin içine gömülen doku örneklerinden mikrotom yardımı ile 5µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler hematoksil-eozin boyama metodu kullanılarak boyandı ve preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. H&E boyanmış karaciğer kesitlerinde ışık mikroskobu düzeyinde histopatolojik incelemeleri yapıldı.

Hazırlanan tüm doku kesitleri Olympus marka, CH40 marka ışık mikroskobunda incelenerek Spot Insight marka 3.2.0. model dijital kamera ve Spot advanced, 4.0.6 version program yardımıyla fotoğraflandırıldı.

3.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde “SPSS 11,0 for Windows” versiyonu bilgisayar paket programı kullanıldı. Kan serumlarında analizi yapılmış olan ALT, AST ölçümünden elde edilen veriler arasındaki farklılık durumları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi, gruplar arası karşılaştırmalarda ise Tukey testi kullanıldı. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (P) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, $p < 0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Biyokimyasal Analizler

4.1.1. Serum örneklerinde biyokimyasal analizler

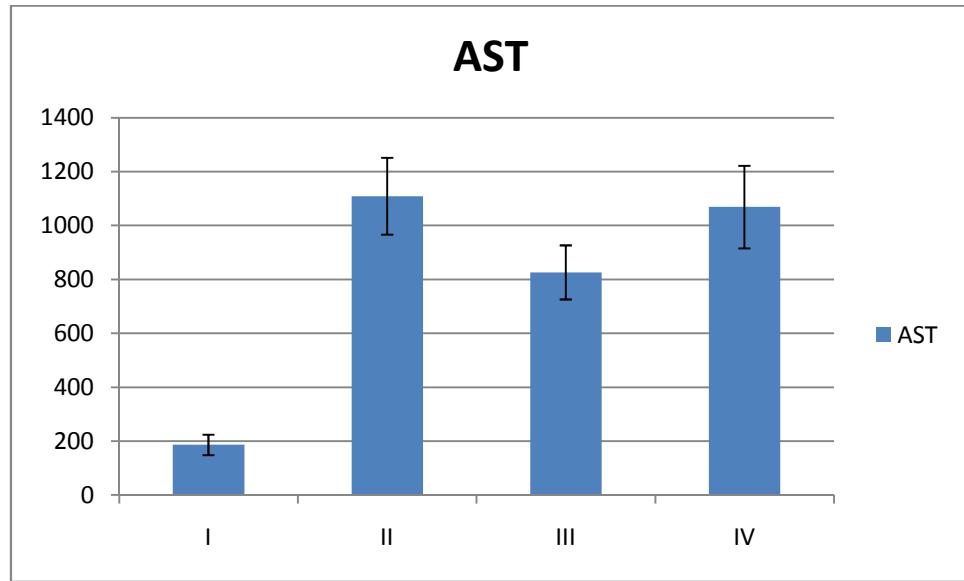
Grup I (Sham) ve Grup II, III, IV'deki deney hayvanlarına ait kan serumlarının biyokimyasal analizlerinden elde edilen AST ve ALT miktarları bu gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen AST, ALT miktarlarının ortalama değerleri \pm standart hata değerleri (n=7).

Gruplar	AST (U/L)	ALT (U/L)
I	186,5571 \pm 38,0466	59,52857 \pm 10,8966
II	1108,971 \pm 142,7836 ^a	886,2 \pm 148,6434 ^a
III	826,4571 \pm 100,2811 ^{ab}	698,7 \pm 124,1061 ^a
IV	1068,9 \pm 153,3612 ^a	855,4286 \pm 176,5092 ^a

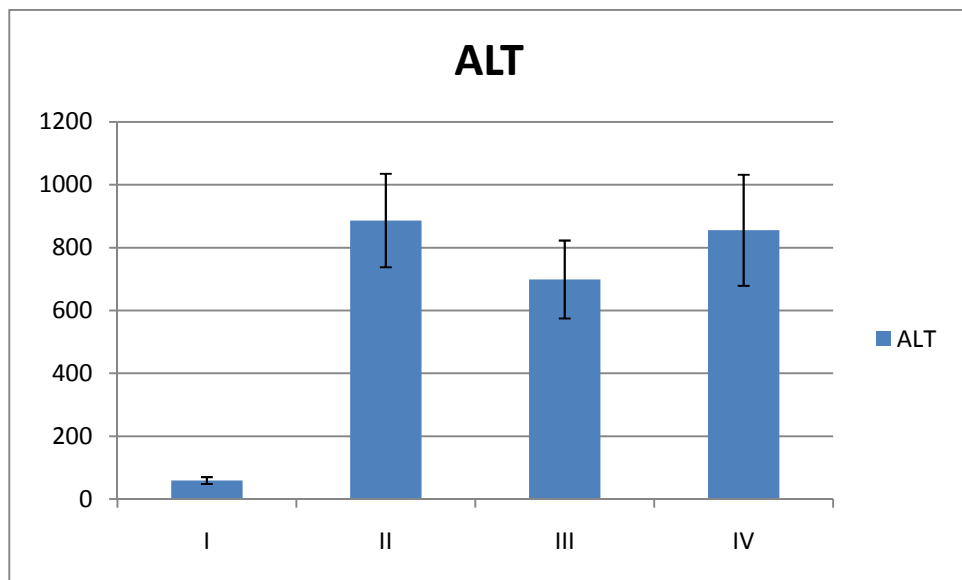
P< 0.05 **a:** Grup I'den; **b:** Grup II'den anlamlı fark vardır.

Buna göre serum AST seviyeleri açısından Grup I (Sham grubu), Grup II, III, IV ile karşılaştırıldığında; Grup II, III, IV' ün serum AST seviyesi Grup I' e göre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0.05). Grup II (İ/R grubu) ile Grup III, IV' ün AST miktarları karşılaştırıldığında ise Grup III, Grup II (İ/R grubu)' ye göre istatistiksel olarak önemli miktarda farklılık gösterdi.(p<0.05). Grup II ile IV arasında ise anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0.05) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Grup I, II, III ve IV'e ait serum AST seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.

Serum ALT seviyelerine bakıldığında ise; Grup II, III, IV ALT seviyeleri Grup I' e göre istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermesi dikkat çekicidir ($p < 0.05$). Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında ise önemli derecede bir farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Grup I, II III ve IV'e ait serum ALT seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.

4.2. Karaciğer Doku Örneklerinde Elektroforetik Analizler

Tüm deney gruplarına ait karaciğer doku örneklerinde Doğal (Native) Jel Elektroforez tekniği ile tespit edilen CAT, Gpx enzim aktiviteleri sonucu ortaya çıkan ve jel üzerinde görüntülenerek ölçülen sayısal alan değerleri elde edildi (Çizelge 4.2).

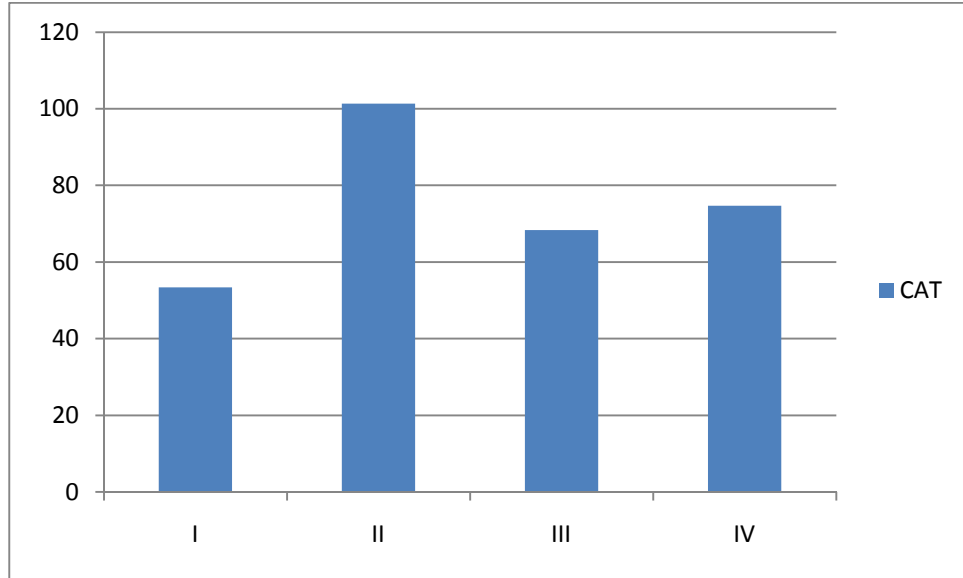
Çizelge 4.2. Deney gruplarına ait hayvanların karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen CAT ve Gpx enzim aktiviteleri sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri

GRUPLAR	CAT mm ²	Gpx mm ²				
		1	2	3	4	5
I	53,42076	25,53605	15,31387	13,91387	14,86157	18,49296
II	101,297	27,13851	18,00619	13,2591	20,03081	19,82404
III	68,3056	23,57174	15,38711	11,71694	17,21357	18,29911
IV	74,65208	24,6702	14,2628	11,63079	18,99696	18,09234

CAT enziminin elektroforetik analiz sonuçlarında tüm gruplarda tek bir band ortaya çıktı. Grup I'e ait karaciğer dokusunda band alanı düşük iken Grup II'deki band alanı en yüksek bulundu. Grup III'de band alanı Grup I'e yakın iken Grup IV'deki band alanı Grup III'e yakın ölçüldü (Şekil 4.3; Şekil 4.4).

Karaciğer dokusunda Gpx enziminin; Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4 ve Gpx5 olmak üzere beş izoformu tespit edildi. Gpx1 izoformunun alanın Grup II'ye göre Grup III'de azaldığı, bunun yanı sıra Grup III'e göre de Grup IV'ün arttığı gözlemlendi. Gpx2 ve Gpx3 izoform alanlarının ise Grup II'ye göre Grup III ve IV'de azaldığı belirlendi. Gpx4 izoformunun alanı Grup II'ye göre Grup III'de azalırken, Grup III ile karşılaştırıldığında Grup IV'de artış olduğu tespit edildi. Gpx3 ve Gpx5 izoform alanları

III. ve IV. Gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında yaklaşık aynı değerlerde olduğu gözlendi (Şekil 4.5.; şekil 4.6).



Şekil 4.3. Grup I, II, III, IV'e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen CAT enzim aktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri (mm²).

GRUP

I

II

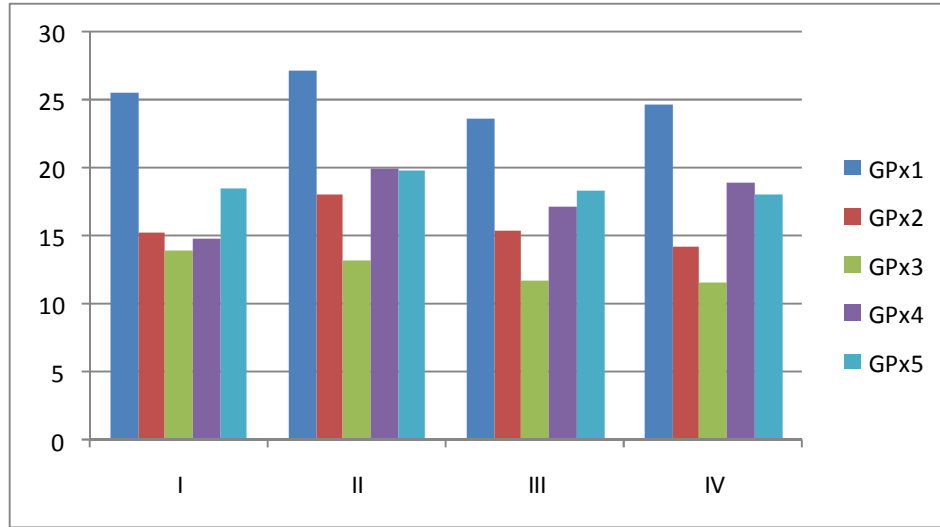
III

IV

CAT

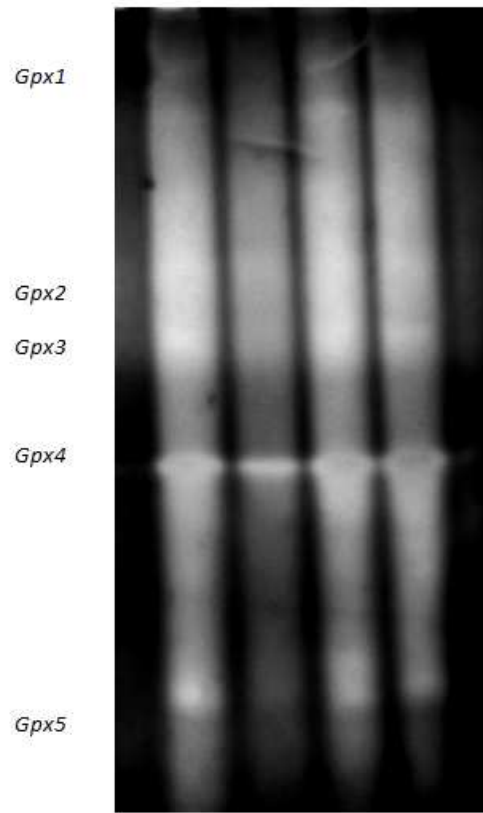


Şekil 4.4. Gruplara ait CAT izoenziminin elektroforetik bandlar



Şekil 4.5. Grup I, II, III, IV'e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen Gpx enzim aktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri (mm²).

GRUP I II III IV



Şekil 4.6. Gruplara ait Gpx izoenziminin elektroforetik bandları

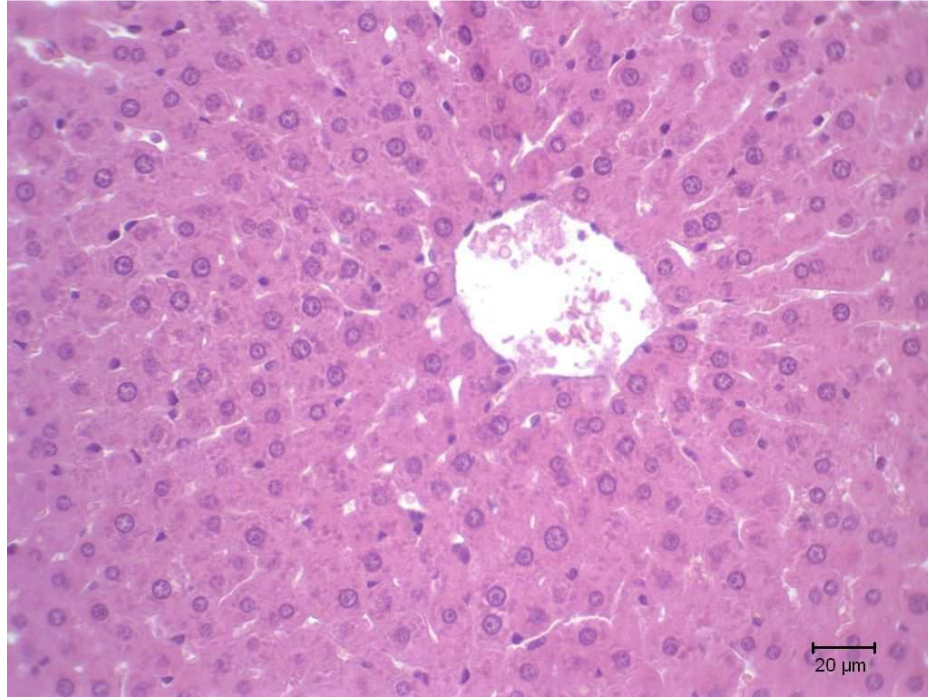
4.3. Karaciğer doku örneklerinin histolojik analizleri

Çalışmamızda karaciğer İ/R hasarına karşı gallik asitin doza bağlı iyileştirme etkisi H&E ile boyanmış karaciğer dokularında detaylı olarak incelendi. Buna göre sham grubu olan Grup I karaciğer dokularında herhangi bir patoloji durum dikkati çekmemiştir. Buna göre vena centralis etrafında kordon şeklinde dizilmiş olan hepatosit hücreleri, sinosoidal alan normal yapıda görülmektedir (Şekil 4.7).

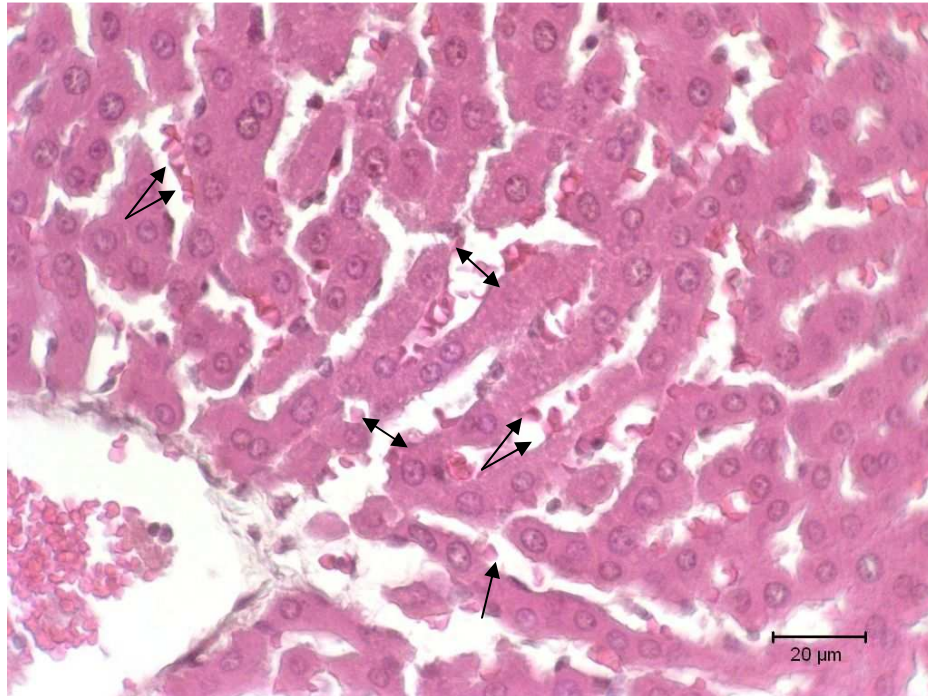
Gallik asit verilmeyen İ/R grubunu oluşturan Grup II karaciğer histolojik doku örneklerinde ise; vena centralis etrafındaki hepatositlerin bütünlüğünü koruyamadığı ve sinosoidal alanın genişlediği gözlemlendi. Ayrıca İ/R hasarına bağlı hiperemi, vakuolizasyon ve yoğun bir şekilde nükleer infiltrasyon gözlemlendi (Şekil 4.8; Şekil 4.9; Şekil 4.10).

50 mg/kg Gallik asit verilen Grup III karaciğer histolojik dokularından elde edilen görüntüler sham grubu ile yakın bulundu. Buna göre; hepatositlerin vena centralis etrafındaki görüntüleri normal görülmekte olup, vakuolizasyon, nükleer infiltrasyon gözlenmedi. Ancak sinosoidal alanda az miktarda da olsa hiperemi gözlenmiştir (Şekil 4.11)

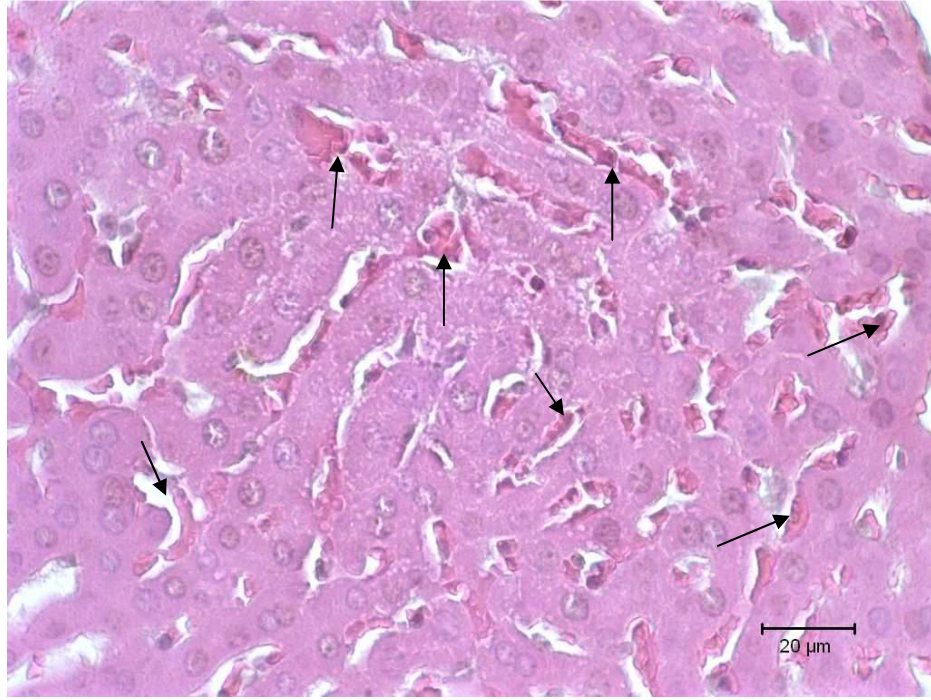
100 mg/kg Gallik asit verilen Grup IV karaciğer dokularında vena centralis'in bütünlüğünü koruyamamıştır ve sinüslerde hiperemi ve genişleme gözlemlendi. Grup II ile karşılaştırıldığında 100 mg/kg gallik asitin koruduğu gözlemlendi; ancak Grup II'de kullanılan 50 mg/kg dozu kadar koruyamadığı gözlemlendi (Şekil 4.12.).



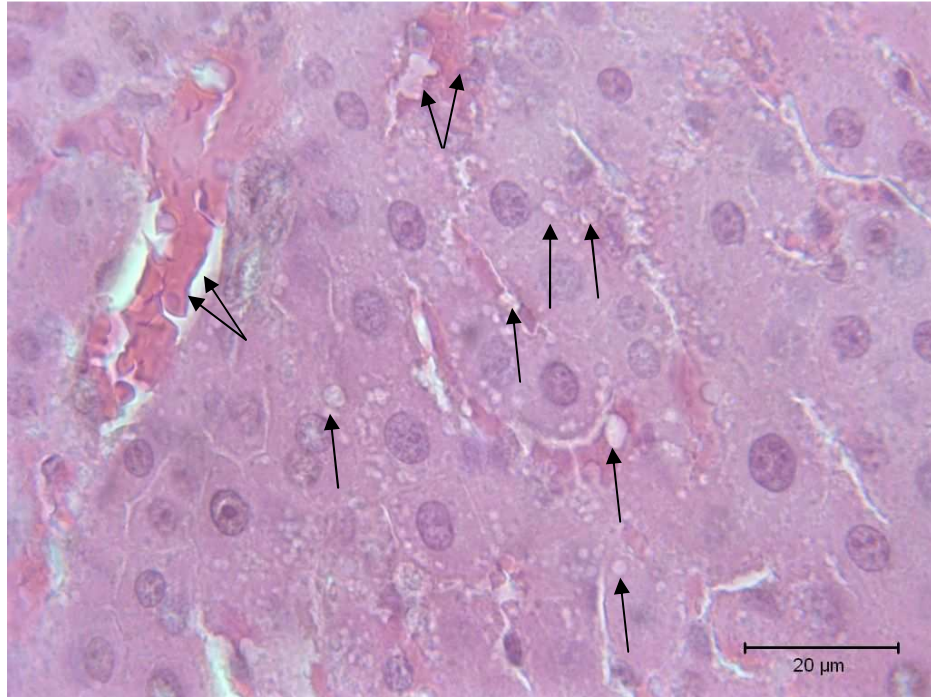
Şekil 4.7. Grup I'e ait karaciğer doku örneklerinde vena centralis ve kordon şeklinde sıralanmış hepatosit hücreleri (HE, X40)



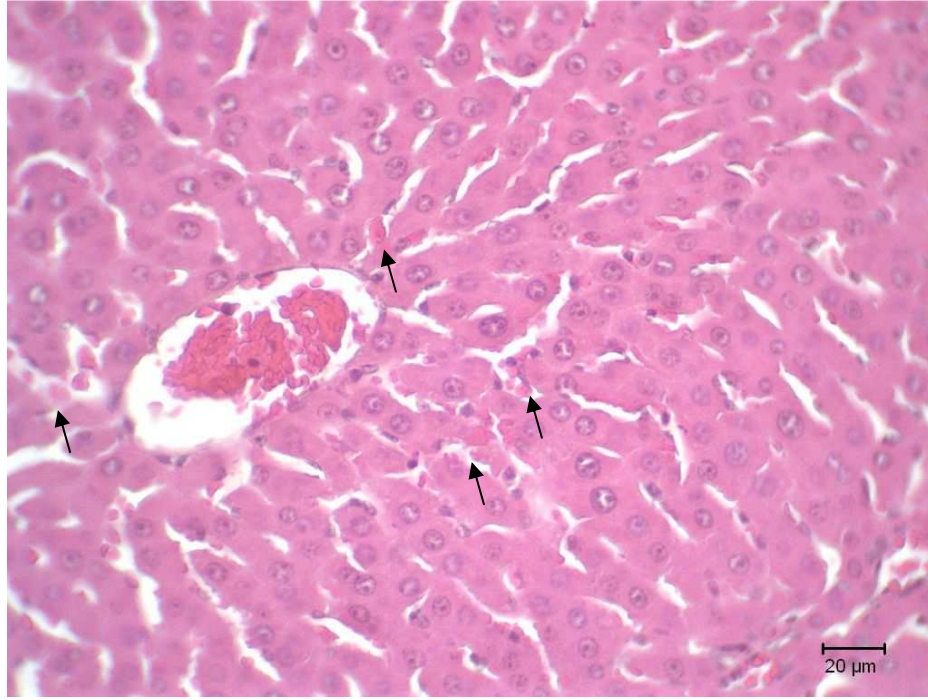
Şekil 4.8. Grup II'e (İ/R grubu) ait karaciğer doku örneklerinde vena centralis ve bütünlüğü bozulmuş hepatosit hücreleri (↗), genişlemiş sinusoid alanları (↔), hiperemi (↘) (HE, X60).



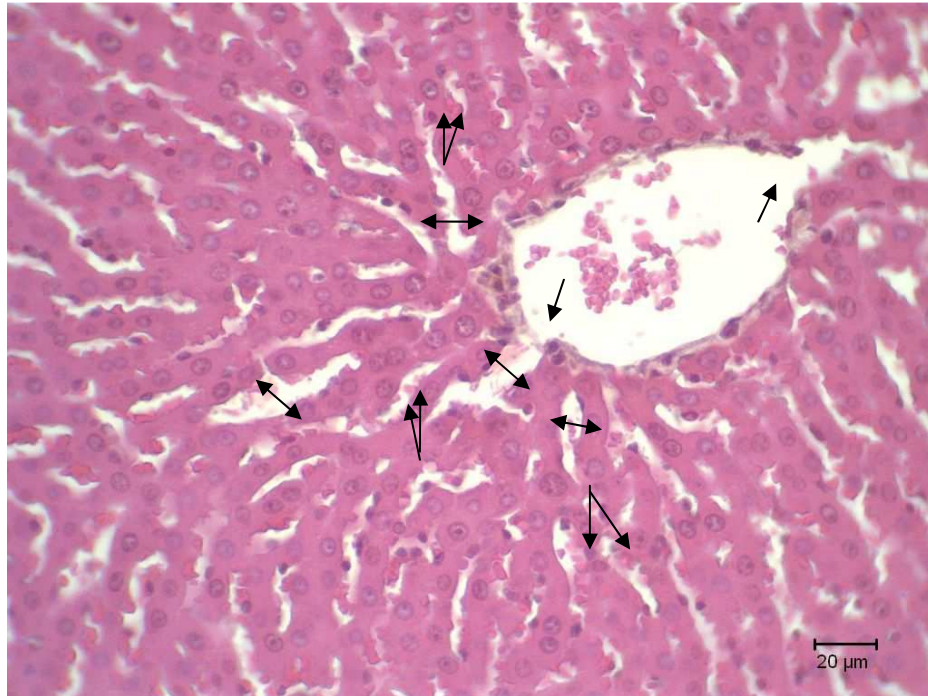
Şekil 4.9. Grup II'e (İ/R grubu) ait karaciğer doku örneklerinde hiperemi (↗) (HE, X60).



Şekil 4.10. Grup II'e (İ/R grubu) ait karaciğer doku örneklerinde vakuolizasyon (↖) ve hiperemi (↗) (HE X100).



Şekil 4.11 Grup III'e ait karaciğer doku örneklerinde vena centralis ve hepatosit sıraları, normal görünümlü sinosoidler, hafif hiperemi (↑) (HE, X40).



Şekil 4.12. Grup IV'e ait karaciğer doku örneklerinde vena centralis (↑) ve hepatosit sıraları, genişlemiş sinosoidler (↔) ile hafif hiperemi (↗) (HE, X40).

5. TARTIŞMA

Bir organa giden kan akımının kesilmesi ile o organ için gerekli olan yeterli oksijen ve enerji gidemez ve bu iskemi sürecini oluşturur. İskemik organa tekrardan kan akımının sağlanması ise reperfüzyon sürecini oluşturur. Patolojik durumun ortaya çıkmasında reperfüzyon sürecinin rol oynadığı bilinmektedir (Montalvo-Jave, et al., 2008). İ/R hasarına sebep olan birçok faktör vardır ancak bunların içinde temel nedenin SOR olduğu düşünülmektedir (Zapletal, et. al., 2008; Montalvo-Jave, et. al., 2008). SOR, hücrede çeşitli fonksiyon bozukluklarına sebebiyet verir (Sroka ve Cisowski, 2003). Bu fonksiyon bozukluklarını ise DNA, lipid ve proteinlere saldırarak yaparlar.

SOR radikalleri CAT, SOD, Gpx gibi endojen antioksidanlar ile (Choi-Kwon, et al., 2004) polifenoller gibi dışarıdan alınan antioksidanlarla etkisiz hale getirilebilir (Akhlaghi and Bandy, 2009; Sroka and Cisowski, 2003). Polifenoller, sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunan ve çeşitli hastalıklardan koruyucu antioksidan, antikanser, antimutajenik etkilere sahip moleküllerdir (El-Beshbishy, et. al., 2004). Fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri yapılarında bulunan hidroksil molekülleri ile ilgilidir ve bunların sayısı, aromatik halkaya bağlanma pozisyonları etkinliklerini değiştirir (Sroka and Cisowski, 2003).

Bu çalışmada kullanılan gallik asit (3,4,5- trihidroksibenzoik asit) yapısında üç hidroksil molekülü içeren fenolik bir bileşiktir. Gallik asit, bitkisel gıdalarda, birada (Sarıkaya, 2005), kırmızı şarapta (Niu, et al., 2004; Kim, et al., 2009; Stanely, et al., 2009), yeşil çayda (Stanely, et al., 2009; Niu, et al., 2004) narda bulunur. En önemli kaynağı çaydır (Gupta, et al., 2007). Gallik asit güçlü, doğal bir antioksidandır. Yapılan çalışmalarda gallik asitin süperoksit, hidroksil (Stanely, 2009) nitrik oksit, peroksinitrit ve nitroksil (Yılmaz ve Toledo, 2004) radikallerini etkisiz hale getirdiği rapor edilmiştir.

Bu bölümde, doğal fenolik bir antioksidan olan gallik asitin (3,4,5-trihidroksibenzenik asit) İ/R işlemi sonrasında oluşan hasara karşı olası koruyucu etkisi, biyokimyasal ve histolojik olarak elde edilen bulgularla tartışılacaktır.

Günümüzde İ/R hasarı sonrasında, karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için en çok kullanılan ALT ve AST aktivitesi tayinidir. Karaciğer hasarı sonucu ALT ve AST enzim aktivitelerinin arttığı bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada karaciğerde; ALT ve AST düzeylerinin artışının İ/R sonrası oluşan serbest radikal kaynaklı doku hasarına bağlı olabileceği rapor edilmiştir. (Yabe, et. al., 2001).

Çalışmamızda; karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek amacı ile ölçülen serum ALT düzeyinde Grup I (kontrol grubu) ile Grup II (İ/R grubu) karşılaştırıldığında anlamlı farklar gözlemlendi ($p < 0.05$). Tedavi gruplarından Grup III (50 mg/kg gallik asit) ve Grup IV (100 mg/kg gallik asit) ALT düzeyinin ise Grup II (İ/R grubu)'ye göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha düşük bulunması gallik asitin koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Serum AST düzeyi bakımından Grup II (İ/R grubu), Grup III (50 mg/kg gallik asit) ve Grup IV (100 mg/kg gallik asit), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu ($p < 0.05$). AST düzeyinde kaydedilen artış Grup II (İ/R grubu)'de yüksek iken, Grup III (50 mg/kg gallik asit) ve Grup IV (100 mg/kg gallik asit)'de anlamlı derecede düşüş gözlemlenmiştir. Özellikle tedavi grubu olan Grup III (50 mg/kg gallik asit)'de görülen AST düzeyinin Grup II (İ/R grubu)'ye göre anlamlı derecede düşük bulunması gallik asitin 50 mg/kg dozunun iskemi reperfüzyon sonrası oluşan hasara karşı etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Canbek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2008), antioksidan olan karvakrolün 45 dk. iskemi, 60 dk. reperfüzyon süresi sonrasında oluşan İ/R hasarına

karşı karaciğeri koruyucu etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda ise serum ALT, AST enzim seviyelerinin İ/R grubunda arttığı, karvakrol verilen grupta ise düşüş olduğunu rapor etmişlerdir. Bu da bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Benzer sonuçlar Baykara ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da (2008) gözlenmiştir. Bu çalışmada antioksidan madde olarak carnosin ve melatonin kullanılmıştır. İ/R süreleri ise 60 dk / 60 dk. olarak belirlenmiş ve karaciğer üzerine koruyucu etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak İ/R grubunda ALT, AST enzim miktarları en yüksek iken, tedavi gruplarında ise düşüş olduğu sonucu belirtilmiştir.

Benzer çalışmalarla da karaciğer İ/R'nun neden olduğu hasarda serum ALT ve AST değerlerinin kontrol gruplarına göre zamana bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Fouad, et.al., 2007; Tata, et al., 2005; Harmancı Özakyol, et al., 2000).

SOR oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinir (Akkuş, 1995). Canlılarda savunma mekanizmasında etkili olan antioksidan enzimlere; SOD, CAT, Gpx ve kimyasal bileşiklere de a-tokoferol, askorbik asit, karotenoid örnek verilebilir (Kim et. al., 2005). O_2^- radikallerinin yol açtığı oksidatif hasara karşı antioksidan savunmada rol alan ilk enzim SOD'dur. CAT ya da Gpx ise H_2O_2 'i zararsız yan ürünlere dönüştürür. Bu yüzden hücrel hasarın şiddetinde önemli rol oynarlar.

Çalışmamızda CAT enziminin elektroforetik sonuçları değerlendirildiğinde, Grup II (İ/R grubu) de CAT enzim aktivitesi en yüksek bulunmuştur. Bunun sebebini iskemik dokunun reperfüzyonu ile SOR üretiminin artmasına bağlayabiliriz. CAT, Gpx enzim aktivitelerinin yükselmesi sonucu bu artmış olan radikallerin böylece elimine edildiğini söyleyebiliriz. Tedavi grupları olan Grup III (50 mg/kg gallik asit) ve Grup IV(100 mg/kg asit) de CAT enzim aktiviteleri ise Grup II ile karşılaştırıldığında daha düşük ölçüldü. Buna bağlı olarak antioksidan özelliği olan gallik asitin İ/R hasarına

karşı koruyucu özelliği olduğu düşünülebilir. Aynı zamanda tedavi grupları olan Grup III (50 mg/kg gallik asit) ve Grup IV (100 mg/kg asit) kendi içinde karşılaştırıldığında 50 mg/kg gallik asit verilen Grup III (50 mg/kg gallik asit)'de CAT enziminin band alanının daha düşük olduğu görüldü. Bu da bize 50 mg/kg gallik asit miktarının daha koruyucu olduğunu ve oksidatif stresi azaltan bir ajan olduğunu ortaya koyar.

Çalışmamız, Gpx izoform alanları açısından değerlendirildiğinde ise İ/R yapılmış Grup II diğer gruplarla karşılaştırıldığında tüm Gpx izoformlarında yükselme görüldü. Tedavi grublarında ise düşük yoğunlukta band alanı kaydedildi. En fazla ise 50 mg/kg gallik asit verilen Grup III'te düşme tespit edildi. Bu da bize 50 mg/kg gallik asitin İ/R hasarına karşı koruyucu olduğunu göstermektedir.

Kapan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2009) aortik İ/R hasarında 30 dk iskemi 60dk reperfüzyon sonucunda, İ/R grubu SOD, CAT değerlerinin anlamlı derecede yüksek olduğunu ve tedavi grubu olan eritropoetin uygulanan sıçanlarda ise düşüş kaydedildiğini rapor etmişlerdir. Bu konuyla ilgili benzer çalışmalarda ise İ/R grubunda enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu rapor edilmiştir (Kiriş vd., 2005; Erten et. al, 2003). Ancak başka çalışmalarda İ/R sonucunda antioksidan enzim miktarlarında düşüş olduğu vurgulanmıştır (Singh et al., 2005; Domashi et al., 2000).

Jayakumar ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında (2007) Gpx izoformlarını native page elektroforezi ile değerlendirdiklerinde bu izoformların tedavi grubunda İ/R grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İ/R grubu ile karşılaştırıldığında 50 mg/kg gallik asit verilen Grup III ve 100 mg/kg gallik asit verilen Grup IV de bu izoformların düştüğü belirtilmiştir.

Demir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (1998); hepatic İ/R hasarına karşı pentoxifylline ve N-acetylcysteine koruyucu etkisi 30 dk. iskemi 20 dk reperfüzyon süresi boyunca araştırılmıştır. Elde edilen CAT ve Gpx enzimlerinin aktivitesi sonuçlarında yine İ/R grubunda CAT ve Gpx enzim aktiviteleri artarken, koruyucu olarak verilen N- acetylcysteine'in CAT ve Gpx enzim aktivitelerini düşürdüğü belirtilmektedir. Bu çalışmalar bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir.

Yapılan başka bir çalışma da iskemi reperfüzyon modeline göre değişik sonuçlar alınmıştır. Fauad et.al., (2007) göre antioksidan madde olan carnosine İ/R'dan 30 dk. önce verilerek karaciğer 30 dakika iskemi/ 120 dk. reperfüzyona maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda bizim çalışmamıza zıt olarak; İ/R grubunda CAT ve Gpx enzim aktivitesinde azalma görülürken carnosine verilen tedavi grubunda CAT ve Gpx enzim aktivitelerinin İ/R grubuna göre arttığı gözlenmiştir. Okuda ve arkadaşlarına göre (1992) SOR'i iskemiye takiben yapılan reperfüzyonun ilk 17 ile 20. dk arasında en yüksek seviyeye ulaştığı kaydedilmiştir (Demir, et. al., 1998). Bizim çalışmamızda ise 30 dk iskeminin ardından 60 dk reperfüzyon yapılmıştır. Sonuçlardaki bu farklılık muhtemelen kullanılan; deney hayvanı türünün, metodun ve modelin (İ/R süreleri gibi) farklılığından kaynaklanabilmektedir. Çalışmamızda İ/R sonucu oluşan oksidatif strese karşı antioksidan enzim seviyelerinin arttığı kaydedildi. Bu artış da özellikle reperfüzyon sonucu oluşan SOR'a karşı oluşmuş bir savunma sistemi olarak değerlendirildi.

Yapılan histolojik incelemelerde (HE) kontrol grubu olan Grup I karaciğer doku örneklerinde; central ven etrafında kordon şeklinde sıralanmış hepatositler düzgün yapı göstermektedir. İ/R hasarına sahip ve hiçbir koruyucu madde verilmeyen Grup II karaciğer örneklerinde ise vakuolizasyon, sinosoidlerde genişleme ve kanama, hepatosit hücre sıralarında bozulmalar gözlemlendi. Grup I ile Grup II'nin karaciğer histolojik olarak karşılaştırıldığında ise iskemi reperfüzyon hasarının oluşturulduğu sonucuna gidilebilir. 50 mg/kg gallik asit verilen Grup III karaciğer histolojik incelemelerinde ise sinosoidler, hepatosit sıraları ve vena centralis görünümleri normal olmakla birlikte yer

yer kanamalar gözlemlendi. 100 mg/kg gallik asit verilen Grup IV karaciğer doku örneklerinde ise korunmanın olmadığı görüldü. Sinosoidlerde genişleme ve bu alanlarda kanama olması korunmanın olmadığını gösterir.

Gallik asitin İ/R hasarının önlenmesinde SOR radikallerinin etkisini ortadan kaldıran bir ajan olarak kullanıldığına ilişkin herhangi bilimsel kayıda rastlanmamıştır. Ancak SOR karşı bir fenolik madde olan gallik asitin antioksidan olarak kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Tung ve arkadaşları (2009) sıçanlarda CCl₄ ün sebep olduğu kronik karaciğer hasarına karşı gallik asitin güçlü bir koruyucu olduğunu bildirmişlerdir. Feique ve arkadaşları (2007) da sıçanlarda sarızambak bitkisinden ekstrakte edilen gallik asitin sıçan karaciğerinde ve kanında lipid peroksidasyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, Jadon ve arkadaşları (2007) ise albino sıçanlarda CCl₄ ün sebep olduğu karaciğer ve böbrek hasarına karşı gallik asitin tedavi edici olduğunu rapor etmişlerdir. Yeh ve Yen çalışmalarında fenolik asitlerin (gallik asit, gentisik asit, ferulik asit p-kumarik asit) antioksidan enzim aktivitesini arttırdığını bulmuş ve fenolik asitlerin oral olarak alınmasının erken zamanlarında sıçan karaciğerinde antioksidan savunma sisteminin arttırıldığını göstermiştir. Krajka-kuzniak ve Baer-Dubowska (2003) yaptıkları çalışmada tannik asidin sıçan karaciğer ve böbreğinde sitokrom P450 aktivitesini arttırdığını görmüşlerdir. Ayrıca fenolik asit alımının sıçanlarda İ/R grubunda SOD, CAT, Gpx mRNA ekspresyonunun kontrole göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Çeşitli çalışmalarda da İ/R hasarı sonucu oluşan oksidatif strese karşı farklı antioksidanların etkili olduğunu göstermiştir (Canbek et al., 2008; Senturk, et al., 2008; Baykara et al., 2009; Rhee, et al., 2002).

Doğal fenolik asitlerin diyetle alınması (meyve, sebze) antioksidan enzimlerin tetiklenmesi açısından çok önemlidir ve bu sayede biok kronik hastalıklarda da (rneğin kanser ve diyabet gibi) nlenebilmektedir (Hsu and Yen, 2007).

Sonuç olarak biyokimyasal ve histolojik analiz verileri göz önüne alındığında, karaciğer İ/R hasarından önce bir fenolik asit olan gallik asitin 50 mg/kg oral dozunun koruyucu etkili olduğu söylenebilir.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Akhlaghi, M., & Bandy, B. 2009, Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* , 46, 309- 317.

Akın, K.o. 2008, Deneysel Karaciğer İskemi/Reperfüzyon Modelinde Tioredoksin ve L-NAME'in Karaciğer Hasarı Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü s. 125.

Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Konya, Mimoza Yayınları.

Aksoy, A., 2007, Alkolik sıçan karaciğeri üzerine karvakrolün etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Araya, J., Tsuruma, T., Hirata, K., Yagihashi, A., Meguro, M., Kawakami, M., Yanai Y., Watanabe N., 2003, The regulation of HGF and TGF-Beta by an angiotensin II type 1 receptor antagonist in hepatic ischemia-reperfusion injury, *Transplantation Proceedings* , 35, 107-103.

Ardite, E., Ramos, C., Rimola, A., Grande, L., & Fernandes-Checa, J. C. ,1999.Hepatocellular oxidative stress and initial graft injury in human liver transplantation, *Journal of Hepatology* , 31:921-927.

Astarcıoğlu, H., 1998, Karaciğer nakli modelinde, mentoksifilinin normotermik ve soğuk iskemiye karşı koruyucu etkisi, Uzmanlık Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı.

Avatgil, R., 1997, Deneysel rat iskemi reperfüzyon böbrek hasarında nitrik oksitin rolü, Uzmanlık Tezi, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, s. 83.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Aydoğdu, N., Kaymak, K., & Yalçın, Ö., 2005, Sıçanlarda böbrek iskemi reperfüzyon hasarında N-Asetilsisteinin etkileri, Fırat Tıp Dergisi, 10(4) 151-155.

Aytekin, Y., Solakoğlu, S., 2006, Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 332-347.

Başer, K. H., 2002, Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri kitapçığı, Eskişehir, 31-44.

Baykara, B., 2006, Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında karnozin ve melatoninin koruyucu etkileri, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilmi Dalı, s. 68.

Baykara, B., Tekmen, İ., 2005, Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dergisi, 19, 3, s. 185-194.

Baykara, B., Tekmen, I., Pekçetin, C., Ulukuş, C., Tuncel, P., Sağol, O., Ormen M., Özoğul, C., 2009, The protective effect of carnosine and melatonin in ischemia-reperfusion injury in the rat liver, Acta histochemica , 111, 42-51.

Bayramoğlu, G., 2010, Sıçanlarda hepatik iskemi reperfüzyon kaynaklı oksidatif stres hasarına karşı gallik asitin olası koruyucu etkileri, Yüksek Lisans Tezi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, s. 93 .

Belmares, R., Contreras-Esquivel, J.C., Rodriguez-Herrera, R., Coronel, A. R., & Aguilar, C. N. ,2004, Microbial production Of tannase: an enzyme with potential use in food industry, Lebensm.-Wiss. u.-Technol , 37, 857-864.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Bulucu, B. Z., 2004, Yüksek lipid içeren diyetin erişkin sıçan karaciğeri üzerine etkilerinin histokimyasal ve morfolojik yöntemlerle incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Burak, M., Çimen, Y., 1999, Flavonoidler ve antioksidan özellikleri, Klinik Tıp Bilimleri , 296-304.

Canbek, M., Uyanoglu, M., Bayramoglu, G., Senturk, H., Erkasap, N., Koken, T., Uslu S., Demirüstü C., Aral E., Hüsnü Can Baser K., 2008, Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver, Photomedicine , 15, 447-452.

Chen, YW., Li, CH., Zhang, AQ., Yang, SZ, Zang, WZ., Dong, JH., 2011, Preserving hepatic artery flow during portal triad blood inflow occlusion reduces liver ischemia-reperfusion injury in rats, Journal of Surgical RESEARCH, 1-7.

Choi-Kwon, S., Park, K.A., Lee, H.-J., Park, M.S., Lee, J.H., Jeon, S.E., Myoung-Ae C., Kyoung-Chan P., 2004, Temporal changes in cerebral antioxidant enzyme activities after ischemia and reperfusion in a rat focal brain ischemia model: effect of dietary fish oil, Developmental Brain Research , 152; 11-18.

Çakatay, U., & Kayalı, R., 2006,. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. Cerrahpaşa Tıp Dergisi , 37:162-167.

Çavdar, C., Sifil, A., & Çamsarı, T, 1997,. Reaktif oksijen Partikülleri ve antioksidan savunma, Türk Nefroloji Diyaliz ve Trasplantasyon Dergisi , 3-4:92-95.

Demir, R., 2006, Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş, Ankara, Palme Yayıncılık.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Demir, S., Inal-Erden M., 1998, Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury, *Clinica Chimica Acta* 275(2) 127-135

Demirtaş Yılmaz, C., 2009, kafeinin rat karaciğerinde oksidan-antioksidan mekanizmalara etkisi, *Uzmanlık Tezi*, Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı , s. 191

Dilek, O. N., 2003, *Karaciğer*, Afyon Kocatepe Üniversitesi Klinik Tıp Kitapları Serisi.

Dobashi K., Ghosh B., Orak J. K., Singh I., Singh A. K., 2000, Kidney ischemia–reperfusion: modulation of antioxidant defences, *Mol. Cel. Biochem.*, 205; 1-11.

Dökmeci, İ., 2007, *Farmakoloji ilaçlar ve etkileri*, Alfa Yayınları.

Dündar, Y., & Aslan, R., 2000, *Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar*, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, No:29.

Ekbul, A., 2004, *Diyetsel Polifenoller ve Kardiyovasküler Sistem*, T Klin Kardiyoloji , 48-54.

El-Beshbishy, H.A., Tork, O.M., El-Bab, M., Autifi, M.A., 2004, Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine-induced liver injury rats, *Pathophysiology* , Article in Press.

Erbaş, M., Gül, S., & Şekerci, H., 2008, *Fonksiyonel gıda bileşeni olarak diyetel antioksidanlar*. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum, 1053-1056.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Erten, S.F., Koçak, A., Özdemir, İ., Aydemir, S., Çolak, A., Reeder, B.S., 2003, Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia, *Spinal Cord*, 41, 533-8.
- Fei Que, M., Mao, L., & Zheng, X., 2007, In vitro and in vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds, *Asia Pac J Clin Nutr*, 16; 196-203.
- Fouad, A.A., El-Rehany, M. A.A., & Maghraby, H. K., 2007, The hepatoprotective effect of carnosine against ischemia/ reperfusion liver injury in rats, *European Journal of Pharmacology*, 572, 61-68.
- Galati, G., O'Brien, P. J., 2004, Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties, *Free Radical Biology & Medicine* , Vol:37 No:3 287-303.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., & Durmaz, Y., 2006, Algal Antioksidanlar, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi* , 23, (1/1): 85-89.
- Gupta, N., Gupta, S., & Mahmood, A., 2007, Gallic acid inhibits brush border disaccharidases in mammalian intestine, *Nutrition Research*, 27, 230-235.
- Günaydın, B., & Çelebi, H., 2003, Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkileri, *Anestezi Dergisi* , 11 (2):87-98.
- Halliwell, B., 1999, Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the end (of the beginning), *free Radical Research*, 31:4, 261-272.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H., 2000, Hydrogen Peroxide in the Human Body, FEBS letters , 486:1-3.

Harmancı Özakyol, A., Tunçel, N., Sarıçam, T., Uzuner, K., Ak, D., & Gürer, F., 2000, Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury, Pathophysiology , 7; 183-188.

Hsu, C.-L., & Yen, G.-C., 2007, Effects of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats, British Journal of Nutrition , 98, 727-735.

Jadon, A., Bhadauria, M., & Shukla, S., 2007, Protective effect of Terminalia belerica Roxb. and gallic acid against carbon tetrachloride induced damage in albino rats, Journal of Ethnopharmacology , 109; 214-218.

Jayakumar, T., Thomas, P. A., & Geraldine, P., 2007, Protective effect of an extract of the oyster mushroom, Pleurotus ostreatus, on antioxidants of malor organs of aged rats, Experimental Gerontology , 42, 183-191.

Kapan, Ş., Kiriş, İ., Kılbaş, A., Altuntaş, İ., Karahan, N., Okutan, H., 2009, Eritropoietinin sıçan aortik iskemi reperfüzyonunda akciğer hasarı üzerine etkisi, Turkish J Thorac Cardiovasc Surg., 17; 110-116

Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., Borsari, B., 2003, Phenolic cycle in plants and environment, Journal of Cell and Molecular Biology , 2:13-18.

Kim, J. H., Lee, B. K., Lee, K. W., & Lee, H. J., 2009, Resveratrol counteracts gallic acid-induced down-regulation of gap-junction intercellular communication, Journal of Nutritional Biochemistry , 20, 149-154.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Kim, SY., Lim, JH., Park, MR., Kim, JY., Park, TI., Seo, YW., Choi, KG., Yun, SJ., 2005, Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced Hydrogen Peroxide in barley roots under saline stress, *J. Biochem. Mol. Bio*, 38, 218-24.

Kiriş, İ., Okutan, H., Savaş, Ç., Yönden, Z., Delibaş, N., 2005, Deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi, *Damar Cerrahisi*, 14; 13-8

Kozluca, O., 1993, Serbest radikaller ve kanser, *Kartal Eğitim ve Araştırma Klinikleri* , 4:1-4.

Krajka-Kuz'niak, V., & Baer-Dubowska, W., 2003, the Effects of tannic acid on cytochrome P450 and phase enzymes, mouse liver and kidney, *Toxicology Letters*, 143; 209-216.

Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L., 2003, *Basic Pathology (Temel Patoloji)*, 7. Edisyon, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.

Kuyumcu, A., Polat Düzgün, A., Özmen, M., & Besler, T., 2004, Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü, *Ulus Travma Dergisi* , 10(3):149-159.

Labieniec, M., Gabryelak, T., 2006, Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method, *Journal of Photochemistry and Photobiology B,Biology*, 82, 72-78.

Lin, HC., Chen, HJ., Hou, WC., 2002, Activity staining ag glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dedocylsulfate polyacrylomide gels, *Electrophoresis*, 23: 513-16.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Mercan, U., 2004, Toksikolojide Serbest Radikaller. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 15(1-2): 91-96.

Montalvo-Jave, E.E., 2008, Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury, Journal of Surgical Research , 147, 153-159.

Morton, L. W., Caccetta, R. A.A., Puddey, I.B., & Croft, K.D., 2000, Chemistry and Biological effects of Dietary Phenolic Compounds: Relevance to Cardiovascular Disease. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 27, 152-1559.

Mühürdaroğlu, B., 2009, Ratlarda karaciğer iskemi-reperfüzyon hasarında, rotenonun hücre apoptozisi ve inflamatuvar süreçte etkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı.

Niu, X., Fan, X., Sun, J., Ting, P., Narula, S., & Lundell, D., 2004, Inhibition of fucosyltransferase VII by gallic acid and its derivatives, Archives of Biochemistry and Biophysics , 425, 51-57.

Onat, T., Emerk, K., & Sözmén, E., 2006, İnsan Biyokimyası Palme Yayıncılık, s. 240-241.

Ortuğ, G., 2001, İnsan Anatomisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları.

Pasanphana, W., Chirachanchai, S., 2008, Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant, Carbohydrate Polymers, 72, 169-177.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Ploots, A., 2005, The groningen hypothermic liver perfusion system of improved preservation in organ transplantation, Ph D-Thesis, University of Groningen.

Port, C. M., 2003, Essential of pathophysiology: Concepts of altered healthy states, 494-515.

Poussios, D., Andreadou, I., Papalois, A., Rekka, E., Gavalakis, N., Aroni, K., Kourounakis, P.N, Fotiadis, C., Sechas, M.N, 2003, Protective effect of a novel antioksidant non-steroidal anti-inflammatory agent(compound IA) on intestinal viability after acute mesenteric ischemia and reperfusion, European Journal of Pharmacology , 465, 275-280.

Rhee, J.E., Jung, S.E., Shin, S.D., Suh, G.J., Noh, D.Y., Youn, Y.K., Oh S.K, Choe K.J., 2002, The effects of antioksidants and nitric oxide modulators on Hepatic ischemic-reperfusion injury in rats, J Korean Med Sci , 17; 502-6.

Sarıçiçek, E., 2009, Deneysel karaciğer sirozunda Nigella sativa'nın (çörek otu) etkisi, Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı.

Sarıkaya, Ö., 2005, Funguslar ile galik asit üretiminde çeşitli bitkisel atıkların kullanılabilirliğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.

Sener, G., Tosun, O., Şehirli, A. Ö., Kaçmaz, A., Arbak, S., Ersoy, Y., Aydanoğlu-Dülger, Y. 2003, Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion, Life Sciences , 72, 2707-2718.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Senturk, H., Kabay, S., Bayramoglu, G., Ozden, H., Yaylak, F., Yucel, M., Gürlek Olgun E., Kutlu, A., 2008, Silymarin attenuates the renal ischemia / reperfusion injury-induced morphological changes in the rat liver, *World J Urol* , 26(4):401-7.
- Seo, M.-Y., Lee, S.-M., 2002, Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic icshemia/reperfusion in rats, *Journal of Hepatology*, 72-77.
- Singh, D., Chander, V., Chopra, K., 2005, Protective effect of catechin on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats, *Pharmacol Rep.*, Jan.-Feb.; 57(1): 70-76.
- Sroka, Z., Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology*, 41; 753-758.
- Stangl, R., Szijarto, A., Onody, P., Tamas, J., Tatrai, M., Hegedus, V., Blázovics, A., Lotz, G., Kiss, A., Módis, K.Gerő, D.,Szabó, C.,Kupcsulik, P., Harsányi, L., 2009, Reduction of liver ischemia-reperfusion injury via glutamine pretreatment, *Journal of Surgical Research* , 1-9.
- Stanely, P., Prince, M., Priscilla, H., & Devika, P. T, 2009, Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats, *European Journal of Pharmacology* , 139, 139-143.
- Şener, G., Yeğen, B.Ç., 2009, İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim*, Cilt:22 No:3 5-13.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Şentürk, H., 2008, Renal iskemi reperfüzyon sırasında sıçan böbreğinde oluşan oksidatif stres hasarına silimarin ve likopen etkisi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı.
- Tata, V.D., Brizzi, S., Saviozzi, M., Lazzarotti, A., Fierabracci, V., Malvaldi, G., Casini A., 2005, Protective Role of Dehydroascorbate in rat liver ischemia reperfusion injury, *Journal of Surgical Research*, 123, 215-221.
- Teke, Z., Kabay, B, Özden, A., 2008, İskemi reperfüzyon hasarının patofizyolojisi, *Pamukkale Tıp Dergisi* , 1:65-72.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi.
- Tunalı, Z., Öztürk, N., Koşar, M., Başer, K. H., Duman, H., Kırimer, N., 29-31 Mayıs 2002, Bazı Sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Kitapçığı, s. 130-138.
- Tung, Y.T, Wu, J.H., Huang, C.C., Peng, H.C., Chen, Y.L., Yang, S.C., Chang S.T., 2009, Protective effect of Acacia confusa bark extract and its active compound gallic acid against carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47; 1385–1392.
- Üstün, F., Aydın, A. S., 2007, Tanenler 2, toksisiteleri, beslenme üzerine etkileri, detannifikasyon, *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* , 33 (1), 33-41.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Valko, M., Leibfritz, D., Mancel, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* , 36:44-84.
- Watanabe, M., Yamaguchi, K., Chijiwa, K., & Tonaka, M., 2001, FR167653 Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion, *Journal of Surgical Research* , 101, 146-151.
- Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahman, M.A., 1971, An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes, *Anal. Biochem.*, 44:301-5.
- Yabe, Y., Kobayashi, N., Nishihashi, T., Takahashi, R., Nishikawa, M., Takakura, Y., et al., 2001, Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia-reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives, *J. Pharmacol. Exp-Ther*, 298: 894-899.
- Yaykaşlı Okcu, E., 2006, Cep telefonu radyasyonunun sıçan (Wistar albino) karaciğer dokusundaki oksidant/antioksidant dengesi üzerine etkisinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü s. 91.
- Yaylak, F., Canbaz, H., Caglıkuleci, M., Dirlik, M., Tamer, L., Ogetman, Z., Polay, Y., 2008, Liver tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and lipid peroxidation in experimental hepatic ischemia reperfusion injury stimulated with lipopolysaccharide: the role of amino guanidine, *Journal of Surgical Research*, 148, 213-214.
- Yeh, C.T., Yen, G.C., 2006, Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression, *J. Nutr.*, 136 (1), : 11-5

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Yıldız, H., & Baysal, T., 2003, Bitkisel fenoliklerin kullanım olanakları ve insan sağlığı üzerine etkileri, Gıda Mühendisliği Dergisi , 29-35.

Yılmaz, İ., 2010, Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi , 17 (2) 143-153.

Yılmaz, Y., Toledo, R. T., 2004, Health aspects of functional grape seed constituents, Trends in Food Science & Technology , 15 422-433.

Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M., htay, H., Iwata, S., Tsubouchi, R., et al., 2002, Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8- hydroxy-20-deoxyguanosine in DNA, Toxicology in Vitro , 16, 705-709.

Zapletal, C., Heyne, S., Breitreutz, R., Gebhard, M.-M., & Golling, M., 2008, The influence of selenium substitution on microcirculation and glutathione metabolism after warm liver ischemia/reperfusion in a rat model, Microvascular Research , 76,104-109.