

**RENAL İSKEMİ/REPERFÜZYON SONUCU OLUŞAN UZAK DOKU
HASARINA KARŞI GALLİK ASİDİN OLASI KORUYUCU ETKİSİ**

Başak DURMUŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ Anabilim Dalı

ŞUBAT 2011

**THE POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF GALLIC ACID AGAINST THE
DISTANT TISSUE INJURY IN CONSEQUENCE OF RENAL
ISCHEMIA/REPERFUSION**

Başak DURMUŞ

M. Sc. THESIS

Department of BIOLOGY

FEBRUARY 2011

Renal İskemi/Reperfüzyon Sonucu Oluşan Uzak Doku Hasarına Karşı Gallik Asidin
Olası Koruyucu Etkisi

Başak Durmuş

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

Danışman: Doç. Dr. Mediha CANBEK

Şubat, 2011

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Başak DURMUŞ'un YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Renal İskemi Reperfüzyon Sonucu Oluşan Uzak Doku Hasarına Karşı Gallik Asitin Olası Koruyucu Etkisi" bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mediha CANBEK

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Üye: Doç. Dr. Berrin AYZAZ TÜYLÜ

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

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Nimetullah BURNAK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu tez çalışmasında; sıçanlarda, deneysel böbrek iskem/reperfüzyon (İ/R) hasarından dolayı karaciğerde oluşan oksidatif strese karşı gallik asitin olası koruyucu etkileri araştırıldı.

35 adet erkek *Sprague dawley* sıçan rasgele seçilerek; Grup I (Kontrol), Grup II (İ/R), Grup III (İ/R + 50mg.kg⁻¹ gallik asit), Grup IV (İ/R + 100mg.kg⁻¹ gallik asit) ve Grup V (İ/R + 200mg.kg⁻¹ gallik asit) oluşturuldu. Ksilazin (10 mg.kg⁻¹) ve ketamin (70 mg.kg⁻¹) anestezisi altında Grup I dışındaki tüm gruplara sağ böbrek nefroktomisi yapıldı. Sonra Grup II'ye SF ve Grup III, IV,V'e de 1 hafta boyunca günde bir kez intraperitonel olarak gallik asit verildi. Ardından bu gruplara 45 dakika iskem / 6 saat reperfüzyon uygulandı. Deney sonunda tüm gruplardan, kan örnekleri ve karaciğer dokuları alındı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Grup I'e göre, Grup II'de serum ALT ve AST değerlerinin ve karaciğer dokusuna ait SOD, CAT, Gpx aktivitelerinin arttığı; Grup III, IV ve V' de de CAT, SOD ve Gpx aktivitelerinin benzer olduğu görüldü. Histopatolojik analizlerde ise Grup II karaciğer dokusunda ileri derecede nekroz, yoğun nükleer infiltrasyon, vakuolizasyon ve yoğun kanama, gözlenmiş olup Grup V'te bu bulgulara rastlanmadı. İmmunhistokimyasal olarak, Grup II'de iNOS reaksiyonu çok yoğun iken, Grup V'te bu yoğunluğun oluşmadığı saptandı. Grup V'teki histolojik ve biyokimyasal değişiklikler bu grupta İ/R hasarının büyük ölçüde önlendiğini gösterdi.

Çalışma, intraperitonel olarak uygulanan gallik asitin 200 mg.kg⁻¹ dozunun renal İ/R hasarından etkilenen karaciğer üzerinde koruyucu etkisi olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: İskem/Reperfüzyon, Gallik asit, Karaciğer, Uzak organ, Antioksidan, Serbest radikal.

SUMMARY

In this thesis was to investigate that possible protective effects of gallic acid in liver injury due to experimental renal ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats.

A total of 35 male *Sprague dawley* rats were divided into 5 groups by randomized selection (n=7). Five groups were designed that Group I (Control), Group II (I/R), Group III (I/R+ 50 mg.kg⁻¹ gallic acid), Group IV (I/R+ 100 mg.kg⁻¹ gallic acid) and Group V (I/R+ 200 mg.kg⁻¹ gallic acid). Right nephrectomies were performed under xylazine (10 mg.kg⁻¹) and ketamine (70 mg.kg⁻¹) anesthesia in all group rats except Group I. Substances were given intraperitoneal in Group II, III, IV and V rats every day along a week and after that 45 minutes of Ischemia and 6 hours of Reperfusion were applied to these groups rats. At the end of the experiment, blood samples and liver tissues were quickly taken from all of the group. All analysis results were evaluated statistically. Due to I/R injury in Group II, serum ALT and AST statistically increased levels. Belonging to Group II's the liver tissue SOD, CAT, Gpx isoenzyme activity was increased compared to Group I. Histopathologically, in Group II's the liver tissue was shown that infiltration, intense congestion, advanced necrosis and intense vakuolization. Although immunohistochemical evaluation in Group II at iNOS reaction was determined very density, this density was not found in Group V. Histopathological and biochemical changes in Group V show that distant organ injury due to renal I/R injury were prevented.

The results of this study have demonstrated that gallic acid (200 mg.kg⁻¹ i.p.) prevents distant organ injury because of renal I/R injury.

Key words: Ischemia/Reperfusion, Gallic acid, Liver, Remote organ, Antioxidant, Free radical.

TEŞEKKÜR

Derslerimde ve Yüksek Lisans çalışmalarında bana danışmanlık eden ve beni yönlendiren değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mediha CANBEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans tez çalışmamda benden bilgilerini, deneyimlerini, yardımlarını esirgemeyen saygın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Gökhan BAYRAMOĞLU, Arş. Gör. Dr. Emre CEYHAN ve Arş. Gör. Dr. Hakan ŞENTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvarda birlikte çalıştığım, sosyal hayatımda ve çalışmalarımı destek veren arkadaşlarım Özgül ÖZALP, Ahmet ÖZEN, Özlem GÜNDÜZ, Özge TURGAK ve Ayşe KARABEK'e teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca benden desteklerini ve sabırlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olduklarını bildiğim ve daima bana güvenen AİLEM'e sevgi dolu teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi	3
2.1.1. Geri dönüşümlü iskemik hasar	3
2.1.2. Geri dönüşümsüz iskemik hasar	5
2.2. Reperfüzyon.....	5
2.2.1. Serbest oksijen radikalleri	7
2.2.2. Polimorf nükleer lökositler	8
2.2.3. Kompleman sistemi.....	8
2.2.4. Endotel hücrelerinin rolü.....	9

İÇİNDEKİLER (devam)

2.3.	İ/R Etkisiyle Uzak Organ Hasarı ve Hücre Adezyon Molekülleri	9
2.4.	Antioksidan Savunma Sistemi	11
2.4.1.	Antioksidan etki tipleri	12
2.4.1.1.	Toplayıcı (scavenging) etki	12
2.4.1.2.	Bastırıcı (quencher) etki	12
2.4.1.3.	Onarıcı (repair) etki	12
2.4.1.4.	Zincir kırıcı (chain breaking) etki	13
2.4.2.	Endojen kaynaklı antioksidanlar	13
2.4.2.1.	Enzim olan endojen kaynaklı antioksidanlar	13
2.4.2.2.	Enzim olmayan endojen kaynaklı antioksidanlar	15
2.4.3.	Eksojen kaynaklı antioksidanlar	15
2.4.3.1.	Vitaminler	15
2.4.3.2.	Bazı ilaçlar	15
2.4.3.3.	Gıdalardaki antioksidanlar	16
2.5.	Fenolik Maddeler ve Gallik Asit	16
2.6.	Karaciğer	21
3.	MATERYAL VE METOD	28
3.1.	Deney Hayvanları	28
3.2.	Deney Grupları	28

İÇİNDEKİLER (devam)

3.3.	Gallik Asit Uygulaması	29
3.4.	Anestezi ve Cerrahi İşlemler	30
3.4.1.	Nefrektomi İşlemleri	30
3.4.2.	İ/R İşlemleri	31
3.5.	Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi	31
3.5.1.	Serum örnekleri.....	31
3.5.2.	İstatistiksel Değerlendirmeler	32
3.5.3.	Karaciğer doku örnekleri.....	32
3.5.3.1.	Karaciğer doku örneklerinin histolojik analizleri	33
3.5.3.2.	Karaciğer doku örneklerinin biyokimyasal analizleri	34
4.	SONUÇLAR.....	40
4.1.	Biyokimyasal Analizler	40
4.1.1.	Serum örneklerinde biyokimyasal analizler	40
4.1.2.	Karaciğer doku örneklerinde elektroforetik analizler	42
4.2.	Karaciğer doku örneklerinin histolojik analizleri	48
4.2.1.	Histolojik analizler	48
4.2.2.	Histolojik analizlerin istatistiksel değerlendirmesi	55
4.2.3.	İmmunohistokimyasal analizler	55
4.2.1.	İmmunohistokimyasal analizlerin istatistiksel değerlendirmesi	58

İÇİNDEKİLER (devam)

5. TARTIŞMA.....	59
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Flavonoidlerin genel yapısı	18
Şekil 2.2 Bitkisel kaynaklı bazı fenolik asit çeşitleri	18
Şekil 2.3 Gallik asidin kimyasal formülü	20
Şekil 2.4 Karaciğerde histolojik olarak altıgen yapıda görülen lobüller (Van der Plaats, 2005).....	23
Şekil 2.5 Karaciğerde sinusoidal yapının detaylı görünüşü (Van der Plaats, 2005).	24
Şekil 4.1 Grup I, II, III, IV ve V' e ait serum ALT seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.	41
Şekil 4.2 Grup I, II, III, IV ve V' e ait serum AST seviyelerinin ortalama ve standart hata grafiği.	42
Şekil 4.3 Gruplara ait CAT izoenziminin elektroforetik bandları	44
Şekil 4.4 Grup I, II, III, IV ve V' e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen CAT enzim aktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri (mm ²).....	44
Şekil 4.5 Gruplara ait SOD izoenziminin elektroforetik bandları	45
Şekil 4.6 Grup I, II, III, IV ve V' e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen SOD enzimaktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri (mm ²).	46
Şekil 4.7 Gruplara ait Gpx izoenziminin elektroforetik bandları.....	47
Şekil 4.8 Grup I, II, III, IV ve V' e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen Gpx enzim aktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri (mm ²).....	47
Şekil 4.9 Kontrol grubu (Grup I) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde sentral ven (SV) çevresindeki hepatositler (H&E).....	48
Şekil 4.10 I/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde PMNL infiltrasyonu (H&E).	49
Şekil 4.11 I/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde sinusoidal kanama (H&E).	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4.12 İ/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde nekrotik alanlar (H&E).....	50
Şekil 4.13 İ/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde hepatositlerde yaygın vakuolizasyon (H&E).	51
Şekil 4.14 İ/R + 50 mg.kg ⁻¹ Gallik asit grubu (Grup III) hayvanlarına ait karaciğer dokusuna ait hepatositlerde vakoluizasyon (H&E).....	52
Şekil 4.15 İ/R + 100 mg.kg ⁻¹ Gallik asit grubu (Grup IV) hayvanlarına ait karaciğer kesiti (H&E).....	53
Şekil 4.16 İ/R + 200 mg.kg ⁻¹ Gallik asit grubu (Grup V) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde neredeyse tamamen korunmuş hepatositler (H&E).....	54
Şekil 4.17 Kontrol grubu (Grup I) hayvanlarına ait karaciğer kesitlerindeki normal görünümlü iNOS negatif hücreler.	56
Şekil 4.18 İ/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitlerindeki iNOS pozitif hücreler	57
Şekil 4.19 İ/R + 200 mg.kg ⁻¹ Gallik asit grubu (Grup V) hayvanlarına ait karaciğer kesitlerindeki normale yakın görünümlü iNOS negatif hücreler	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 4.1 Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen ALT ve AST miktarlarının Ortalama değerleri \pm Standart hata değerleri (n=7)	40
Çizelge 4.2 Karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen CAT, SOD, Gpx enzim aktivitelerinin band alanları (mm ²)	43
Çizelge 4.3 Gruplara ait histolojik değerlendirme	55
Çizelge 4.4 Gruplara ait immünohistokimyasal değerlendirme	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μ	mikrometre= mikron= 10^{-6} metre
μm	mikrometre
mm	milimetre
U	unit
mg	miligram
kg	kilogram
kg^{-1}	1 / kilogram
n	denek sayısı
ml	mililitre
l	litre
rpm	revolution per minute (devir/dakika)
$^{\circ}\text{C}$	santigrad derece
μg	mikrogram
mM	milimolar
N	normal
V	volt
mA	miliamper
H	hidrojen
Cu	bakır

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Zn	çinko
Mn	mangan
O	oksijen
Mg	magnezyum
Na	sodyum
K	potasyum
Ca	kalsiyum

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Acıklama</u>
DNA	Deoksiribonükleik asit
İ/R	İskemi/Reperfüzyon
ATP	Adenozin trifosfat
ATPase	Adenozin trifosfataz
AMP	Adenozin monofosfat
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
RNA	Ribonükleik asit
SOR	Serbest oksijen radikalleri
O_2^-	Süperoksit radikali
OH^-	Hidroksil radikali
H_2O_2	Hidrojen peroksit radikali
O_2	Moleküler oksijen
NO	Nitrik oksit
$ONOO^-$	Peroksinitrit
PMNL	Polimorf nükleer lökosit
VCAM-1	Vasküler hücre adhezyon molekülü 1
ICAM-1	İntersellüler adhezyon molekülü 1
PUFA	Poly unsature yağ asidi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

MDA	Malondialdehid
RNS	Reaktif azot türleri
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör-alfa
IL-1	Interlökin-1
SOD	Süperoksit dismutaz
CAT	Katalaz
Gpx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
BHT	Butylated hydroxytoluene
BHA	Butylated hydroxyanisole
ROO \cdot	Lipid peroksi radikali
RO \cdot	Alkoksi radikali
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
NO \cdot	Nitroksil anyonu
NK	Natural killer hücreleri
RES	Retikuloendotelyal sistem
AST	Aspartat transaminaz
SGOT	Serum glutamat-oksaloasetat transaminaz
ALT	Alanin transaminaz
SGPT	Serum glutamat-pirüvat transaminaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

H&E	Hematoksilin ve Eosin
NOS	Nitrik oksit sentetaz
cNOS	Yapısal nitrik oksit sentetaz
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
AP	Amonyum persülfat
NBT	Nitroblue tetrazolium
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
PMS	Fenazin metasülfat
HCl	Hidroklorik asit
TEMED	Tetrametil etilen diamin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir dokuya ya da organa gelen kan akımının azalması veya durmasına iskemi adı verilir. Reperfüzyon ise, iskemi sonucu oluşan dokuda enerji ihtiyacının karşılanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için dokuya ya da organa kan akımının yeniden başlaması olayıdır (Bilzer and Gerbes, 2000; Serracino, et al., 2001; Montalvo-Jave, et al., 2008). Reperfüzyon, sadece iskemi sonucu oluşan hasara göre doku ya da organlarda daha ciddi hasara neden olur (Zimmerman and Granger 1992). Reperfüzyon hasarının sebebi ise serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasıdır (Basım, 2005; Özel, 2006).

İ/R hasarı, kalp, kas, karaciğer, akciğer, böbrek ve barsaklarda sık rastlanan ve ciddi patolojilere yol açan birçok olaya neden olur (Saba, vd., 2000). Böbrek iskemisi; sistemik hipotansiyon, hipovolemik şok, aort klemplenmesi, böbrek transplantasyonu, kısmi nefrektomi, travma, böbrek yetmezliği ve çeşitli ürolojik girişimlerde gelişen bir durumdur (Baker, et al., 1985; Baron, et al., 1991; Woolfson, et al., 1994; Weight, et al., 1996; Conesa, et al., 2001). İ/R sonrası akut renal hasardan dolayı morbidite (hastalanma) ve mortalite (ölüm) oranı artabilmektedir (Senturk, et al., 2008).

Serbest radikaller ve dokulara verdikleri bu hasar antioksidanlar sayesinde önlenbilir. Bu antioksidanlar CAT, SOD, Gpx gibi endojen kaynaklı olabileceği gibi vitamin C ve E gibi eksojen kaynaklı da olabilirler (Şener ve Yeğen, 2009). Eksojen kaynaklı bir antioksidan olan gallik asit bitkilerde doğal olarak bulunan polifenol bileşiklerden (3,4,5-trihidroksi benzoik asit) biridir (Lu, et al., 2006). Siyah çay, yeşil çay, üzüm, vişne, ahududu ve patates gibi pek çok bitkide bulunmaktadır (Morton, et al., 2000 a; Gramza and Korczak, 2005). Gallik asit antibakteriyel, antifungal, antikanser, antiinflamatuvar, antiatherolsklerotik, antimutajenik ve hipolipidik etkiye sahiptir (Kroes, et al., 1992; Sakaguchi, et al., 1998; Akiyama, et al., 2001; Pellegrina, et al., 2005; Janga, et al., 2008; Yang, et al., 2008; Zhang, et al., 2008). Bunların

yanında; lipid peroksidasyonunu ve DNA ipliğinde oluşan kırıkları da azaltır (Shahrzad, et al., 2001; Yilmaz and Toledo, 2004).

Karaciğer ve böbrek vücutta homeostasisi düzenler ve toksik ürünlerin zararsız hale getirilip atılmasını sağlar (Kadkhodae, et al., 2009). Böbrek veya karaciğer dokusunda oluşan hasar birbirlerini etkileyebilir. İ/R' nin başlangıçta iskemik hasara uğramayan organlar üzerine de yıkıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir (Teke, vd., 2008). Böbrek kan akımının azalması veya durması sonucu oluşan İ/R ile birlikte kan akımının kesildiği bölgede hasar olduğu gibi, uzak organlarda da çeşitli derecelerde hasarlar meydana gelebilmektedir (Basım, 2005; Karabiga, vd., 2007; Gulec, et al., 2008; Şener ve Yeğen, 2009). Karaciğer, renal İ/R tarafından oksidatif stres etkisi altında kalıp hasara uğrayabilir ve karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu artabilir (Fadillioglu, et al., 2008).

Renal I/R' nin karaciğerde oluşturduğu bu oksidatif hasarın, gallik asit ile giderilebileceği düşünülerek; bu çalışmada, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulmuş renal İ/R' nin karaciğerde yol açtığı hasarda antioksidan özelliği bilinen gallik asidin olası koruyucu etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesi veya durması iskemi olarak tanımlanır. İskemi sonucunda doku hipoksida kalır ve hipoksik doku hasarı da ortaya çıkar. İskemi, hücrede enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin birikmesine yol açarak hücrenin fonksiyon kaybına, hücre bütünlüğünün bozulmasına ve hücre ölümüne neden olur (Welbourn, et al., 1991; Zimmerman and Granger, 1992).

Dokularda iskemiye karşı dayanıklılık birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabilir fakat nöronlarda ise dakikalar içinde geri dönüşümsüz yıkım oluşabilir. İskemiye uğramayan bölgelerde de oksidatif hasar oluşabilir. Kan akımının kesildiği bölgede lokal doku hasarı oluşurken bu alan dışındaki bölgelerde de uzak organ hasarı meydana gelebilir (Basım, 2005; Karabiga, vd., 2007; Şener ve Yeğen, 2009).

İskemi, organ veya dokuya gelen kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişip geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre ve/veya doku zedelenmesine neden olabilmektedir (Kandilci ve Gümüsel, 2005).

2.1.1. Geri dönüşümlü iskemik hasar

Hücresel fonksiyonlar oksijen varlığında ve yüksek enerjili fosfat bağları gerektiği için aerobik metabolizma ile gerçekleşir. Oksijen yetersizliğinde ise anaerobik metabolizma devreye girer. Bununla birlikte laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile asidoz ortaya çıkar. İskemik dönemde asidoz sonucu normal enzim kinetiği

değişerek hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler oluşur. İskemi ilk olarak hücrenin aerobik solunumuna zarar verir. İskemiyle birlikte ortaya çıkan hipoksiye bağlı olarak hücrede oksijenli solunum felç olur ve ATP düzeyi azalır. Hücrede ATP' nin azalmasıyla birlikte birçok hücrel fonksiyonda da azalma ve bunlara paralel olarak gerçekleşen çeşitli yapısal bozukluklar oluşur. Bu nedenle hücre, hücrel denge için gerekli olan enerjiden yoksun kalır. Hücrel denge için gerekli enerji kaynaklarının (özellikle ATP'nin) tüketimi, hücre zarında iyon dengesizliğine neden olur. Na^+ - K^+ -ATPase pompasının yavaşlamasına bağlı olarak hücre içinde Na^+ ve Ca^{++} birikirken K^+ azalır. Katı madde birikimiyle birlikte izoozmotik su birikimi akut hücrel şişmeye neden olur (Basım, 2005; Ergün, 2006; Cebeci, 2007; Şener ve Yeğen, 2009).

İskemi sırasında ATP üretimi durur, fakat ATP kullanımı devam ettiğinden ATP' den AMP ve adenosin oluşur. Adenosin, hücre dışına difüze olup inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu ATP yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve Ksantin dehidrogenaz'ın, Ksantin oksidaz'a dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin, NAD^{+} ' yı kullanarak ksantin ve ürik asite metabolize olur. Ancak, hipoksi ya da iskemi nedeniyle Ksantin dehidrogenaz, Ksantin oksidaz'a dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü moleküler oksijen kullanılarak Ksantin oksidaz tarafından gerçekleştirilir (Parks, et al., 1988; Şener ve Yeğen, 2009).

Dokularda meydana gelen biyokimyasal ve patolojik bozukluklar kan akımı tekrar sağlanırsa geri dönüşümlüdür; fakat iskemi devam ederse oluşan hasar geri dönüşümsüz olur.

2.1.2. Geri dönüşümsüz iskemik hasar

Mitokondri ve mitokondri kristalarında aşırı vakuolizasyon, plazma zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme geri dönüşümsüz zedelenmeye yol açan hasarlardır (Cebeci, 2007).

Geri dönüşümsüz hasarın ortaya çıkmasında en önemli morfolojik değişiklik hücre membranı hasarı ve bu hasar ile ilgili bazı mekanizmalardır. Membran hasarı sonucu Ca^{++} , yüksek yoğunlukta bulunduğu hücre içinden hücre dışına geçer ve iskemik dokuda reperfüzyon sağlanırsa kitlesel kalsiyum alınımı olur. Mitokondriler tarafından kolayca alınan, amorf kalsiyumdan zengin yapılar mitokondri matriksinde gelişir ve kalıcı şekilde mitokondri hasarına yol açar. Proteinler, temel koenzimler, RNA ve hücre içi yüksek enerjili fosfatın yapımında kullanılacak ATP' nin yeniden oluşumu için yaşamsal önemi olan metabolitler aşırı geçirgen zarlardan sürekli kaybedilir. pH'nın düşmesi lizozom zarlarının zedelenmesine ve enzimlerinin sitoplazmaya geçmesine ayrıca, asit hidrolazların aktifleşmesiyle sitoplazmik ve çekirdek yapılarının sindirimine neden olur. Hücre ölümü ile hücre organelleri devamlı parçalanır ve hücresel enzimler hücre dışına salınırlar. Sonuç olarak ölü hücreler miyelin oluşumlarına ve fosfolipidden oluşan büyük kitlelere dönüşürler. Bunlar daha sonra diğer hücreler tarafından ya fagosite edilir ya da yağ asitlerine parçalanırlar. Daha sonra lizozomal membran hasarı sonucu bunların enzimleri serbestleşip hücrede sindirimi başlatarak hücre ölümünü gerçekleştirir (Ergün, 2006).

2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, iskemi sonucu oluşan dokuda enerji ihtiyacının karşılanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için dokuya ya da organa kan akımının yeniden başlamasıdır (Bilzer and Gerbes, 2000; Serracino, et al., 2001; Montalvo-Jave, et al., 2008). İskemi olmuş doku ya da organa reperfüzyon, sadece iskemi kaynaklı hasara

göre daha çok hasara sebep olur (Zimmerman and Granger, 1992). Reperfüzyon hasarında ise solunum sırasında hücreye moleküler oksijen girmesiyle SOR oluşur. Reperfüzyon hasarının daha ciddi hasarlar oluşturmasının asıl sebebi SOR kaynaklarıdır (Wilhelm, 1990; Basım, 2005; Özel, 2006).

Reperfüzyon hasarına duyarlı yapılar; zar lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlardır. Fakat lipitler en hassas olanlarıdır (Wilhelm, 1990; Akkuş, 1995). Memeli hücreleri, trigliserit ve fosfolipidlerin yapı taşlarını oluşturan yağ asitleri ile birlikte, linoleik ve araşidonik asiti de kapsayan çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) miktarı açısından oldukça zengindir.

PUFA' lar oksidatif strese karşı oldukça hassastırlar (Acworth, et al., 1997). Membranda bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış (çift) bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olabilir. İlk önce yağ asidi, hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanır ve lipit radikalini oluşturur. Lipit radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksil radikalini oluşturur. Lipit peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Lipit peroksiller ortamdaki hidrojen atomları ile reaksiyona girerek lipit hidroperoksidleri oluştururlar. Lipit peroksidler daha sonra MDA ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşümler. Bu yıkım ürünleri de DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilir ve mutajenik etki gösterirler. Üç veya daha fazla çift bağa sahip olan yağ asidlerinin peroksidasyonu sonucu MDA oluşur (Memişoğulları, 2005).

Sağlıklı bireylerde normal metabolizma sonucunda oluşan SOR' lar vücudun savunma mekanizması olan antioksidan enzim sistemiyle uzaklaştırılır ve oksijen radikalleri, antioksidan savunma mekanizması ile denge halindedir. Bu denge serbest radikallerin lehine bozulursa oksidatif stres oluşur (Karaca ve Güder, 2009).

İ/R hasarlanmasını önleyen pek çok endojen kaynaklı antioksidan mekanizması vardır ve ekzojen kaynaklı olarak da hasarı engelleyebilen birçok ilaç tanımlanmıştır (Basım, 2005).

İ/R hasarının fizyopatolojisindeki değişikliklere; birbirleriyle ilişkileri karmaşık, çeşitli hücrel ve humoral faktörler sebep olur (Homer-Vanniasinkam, et al., 1997; Monsinjon, et al., 2001). Bunlar:

- Serbest oksijen radikalleri,
- Polimorf nükleer lökositler,
- Kompleman sistemi,
- Endotel hücreleridir (Özel, 2006; Şener ve Yeğen, 2009) .

2.2.1. Serbest oksijen radikalleri

Eşleşmemiş elektron içeren, kısa ömürlü, kimyasal reaktiviteleri yüksek atom veya moleküllere serbest radikaller adı verilir (Alper, 1993; Aşıcıoğlu, 2005; Valko, et al., 2007). Serbest radikaller kimyasal olarak kararsız yapıda olduklarından atom veya moleküller ile etkileşerek dış yörüngesindeki elektronu eşleyip kararlı duruma gelmeye çalışırlar (Akkoç, 2008).

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen kaynaklı olan serbest oksijen radikalleridir (Aşıcıoğlu, 2005). İ/R hasarı ile ilgili yapılan son çalışmalar, O_2^- , OH^- , H_2O_2 gibi SOR' ların ve NO ya da $ONOO^-$ gibi reaktif nitrojen türlerinin etkili olduğunu düşündürmektedir (Noiri, et al., 2001). Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, endoplazmik retikulum sitokrom P450, lipooksijenaz,

siklooksijenaz, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz SOR kaynakları arasında sayılabilir (Curtin, et al., 2002).

Serbest radikaller en büyük zararı hücre zarlarına verir. Bunlar hücre zarlarındaki lipidlerden elektron çalarak kararlı hale geçme eğilimindedirler, böylece hücre zarı ve sonuç olarak da hücre yapısı bozulur (Gökpınar, vd., 2006).

2.2.2. Polimorf nükleer lökositler

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir (Lopez-Neblina, et al., 1996). İ/R sonucu lökositlerin aktive olması ve kemotaksis gerçekleşmesi, PMNL'lerin endotel hücrelerine adezyonunu sağlar (Frangogiannis, 2007). Ayrıca PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir (Eltzschig and Collard, 2004). PMNL'lerin aktivasyon ve göçleri endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri sayesinde olur (Woodfin, et al., 2007).

2.2.3. Kompleman sistemi

İ/R hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak netlik kazanmamıştır (Şener ve Yeğen, 2009). Ancak kompleman sisteminin aktivasyonu sonucunda öncü inflamatuvar bileşenler oluşur ve bunlar lökositleri aktive ederler. Ayrıca kompleman sistemi; VCAM-1, ICAM-1, E-selektin, P-selektin gibi lökosit adhezyon moleküllerinin sentezini uyarır (Suzuki, et al., 1991; Zhang, et al., 1999).

2.2.4. Endotel hücrelerinin rolü

Endotel hücreleri İ/R hasarının oluşmasında önemli rol oynar. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına sebep olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin ve NO'yu üretir (Şener ve Yeğen, 2009). Endotelin, damar endotelinden salınan 21 aminoasit içeren bir peptid olup molekülünde iki disülfür köprüsü bulundurur. Çeşitli kimyasal ve fiziksel uyarılar arter endotelinden bu peptidin salınmasına neden olur. Endotelinin hücrel etkisi Ca^{++} kanallarının aktivasyonu ile başlar (Baykal, vd., 1996). İ/R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulularak arteriyel bozukluklar oluşturur (Garc'a-Villalón, et al., 2008).

2.3. İ/R Etkisiyle Uzak Organ Hasarı ve Hücre Adezyon Molekülleri

Uzak organ hasarı, İ/R hasarı olan organdan uzaktaki çeşitli organlarda da görülebilen bir çeşit oksidatif hasardır (Gulec, et al., 2008). Örneğin renal iskemik hasar; beyin, kalp, karaciğer, kemik, mide, barsak, akciğer gibi organlarda hasara neden olur (Golab, et al., 2009; Sızlan, et al., 2009). İ/R hasarı sistemik inflamatuvar yanıtı indükleyip SOR ve RNS gibi zararlı yapıların salınmasına neden olur (Sızlan, et al., 2009). İ/R sonucu PMNL'lerin aktivasyonunu takiben kemotaksis gerçekleşir ve nötrofil endotel hücre adezyonu olur (Frangogiannis, 2007).

Aktif nötrofiller, SOR ve proteaz salgılayarak İ/R hasarına katkıda bulunurlar. Nötrofiller reperfüzyonun erken safhalarında toplanırlar ve nötrofillerin endotel hücrelerine adezyonu gerçekleşir. Bu adezyon, endotel hücrelerinin membranında bulunan ICAM ile nötrofil membranında bulunan selektin ve integrinlerin etkileşimi ile

olur. İ/R, TNF- α ve IL-1 sentezi sonucu, endotel hücrelerinde ICAM oluşumunu arttırır (Montalvo-Jave, et al., 2008). Kupffer hücrelerinden üretilen IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler ve TNF- α , karaciğer hasarı gelişmesinde erken mediatördür (Baykara ve Tekmen, 2005). TNF- α hücre ölümünü uyararak dokulardaki hasarlanmış ya da istenmeyen hücrelerin elenmesini sağlar. IL-1 gibi sitokinler büyüme faktörleri grubundan olup kan hücrelerin gelişimi ve farklılaşmasını düzenlerler ve de bağışıklık sisteminin oluşturduğu yanıt sırasında lenfositlerin aktivitesini kontrol ederler (Cooper and Hausman, 2006).

PMNL'lerin aktivasyon ve göçleri endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adezyon molekülleri denilen transmembran proteinler tarafından gerçekleşir (Cooper and Hausman, 2006; Şener ve Yeğen, 2009).

Hücre adezyon molekülleri dört büyük gruba ayrılır:

- Selektinler,
- İntegrinler,
- İmmünglobulin süper ailesi,
- Kaderinler (Saygılı ve Gültekin 1999; Cooper and Hausman, 2006; Terekeci, vd., 2008; Şener ve Yeğen, 2009; Şensoy ve Öznurlu 2009).

Selektinler, integrinler ve kaderinler Ca⁺⁺ veya Mg⁺⁺ bağımlı çalışırlar (Cooper and Hausman, 2006; Terekeci, vd., 2008). Hücre adezyon moleküllerinin en önemli fonksiyonları; hücre-hücre bağlantısı (embriyonal gelişim ve morfogenez), hücre hareketi (lökosit göçü ve immun cevap) ve hücreler arası haberleşme (sinaptik bağlantı kurulması) olarak bilinir (Şensoy ve Öznurlu, 2009).

Nötrofil lökositlerin damardan bağ dokusuna göçleri şu şekilde gerçekleşir: nötrofil yüzeyinde bulunan selektin ile endotel hücrelerin yüzeyindeki selektin reseptörlerinin etkileşimi sonucunda nötrofil, endotel hücrelerine tutunarak hareket eder ve endotel hücreleri tarafından salınan kemokinlere yanıt oluşturur. Kemokinler, nötrofil yüzeyindeki integrin (VLA-5) ve immünoglobulin süper ailesine (ICAM, VCAM) ait diğer adhezyon moleküllerinin ifadesini uyarır. İntegrin ve immünoglobulin süper ailesine ait adhezyon molekülleri nötrofilin endotel hücreleri üzerindeki reseptörüne tutunmasını sağlar. Nötrofil, bağ dokusuna geçip daha önce mast hücrelerinden salınan histamin ve heparin ile genişlemiş olan hücreler arası alandan yabancı maddeleri fagosite eder. Nötrofiller bağ dokusuna girdiğinde, kemotaksi sayesinde hasarlı bölgeye daha fazla nötrofil göçü olur. (Akay, 2006; Cooper and Hausman, 2006; Şener ve Yeğen, 2009).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemi

Organizmanın sağlığı prooksidan/antioksidan dengesinin bozulmamasına bağlıdır (Şener ve Yeğen, 2009). SOR oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için hücresel birçok savunma mekanizmaları yani antioksidan savunma sistemleri vardır. Antioksidanlar endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı olabilirler. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya SOR toplayarak lipit peroksidasyonunu önlemeye çalışırlar (Akkuş, 1995).

Böylece oksidatif hasarın yarattığı doku hasarı en aza indirilmiş olur. Hücre oksidatif strese maruz kaldığı takdirde, hücre hasarından ölümüne kadar giden birçok patolojik değişiklik ortaya çıkabilir (Aşıcıoğlu, 2005). Serbest radikallerin zararlı etkilerini gidermek için besinlerle birlikte antioksidan alınmasında yarar vardır.

2.4.1. Antioksidan etki tipleri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

2.4.1.1. Toplayıcı (scavenging) etki

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller bu tip bir etki gösterirler (Reiter, 1995; Karihtala, et al., 2007).

2.4.1.2. Bastırıcı (quencher) etki

Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki denir. Vitaminler, flavonoidler, trimetazidin ve antosiyanoidler bu tip bir etki gösterirler (Cherubini, et al., 2008).

2.4.1.3. Onarıcı (repair) etki

Serbest oksijen radikallerinin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde bir etki gösterirler (Mickle and Weisel, 1993).

2.4.1.4. Zincir kırıcı (chain breaking) etki

Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller bu tip bir etki gösteren maddelerdir (Virág and Szabó, 2002).

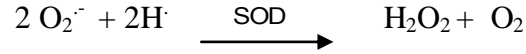
2.4.2. Endojen kaynaklı antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim olanlar ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Akkuş, 1995).

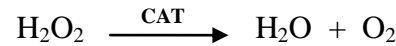
2.4.2.1. Enzim olan endojen kaynaklı antioksidanlar

Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, SOD, CAT, Gpx, glutatyon-S-transferaz, hidroperoksidaz bu grupta yer alan enzimlerdir (Şehirli 2001, Valko, et al., 2007).

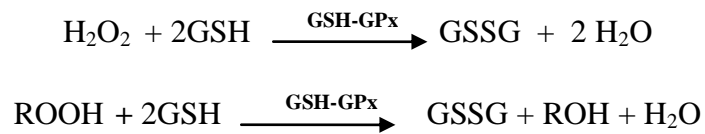
SOD; Süperoksit radikallerini daha az reaktif olan H_2O_2 ve O_2 formuna çeviren antioksidan enzimdir (Şener ve Yeğen, 2009). İnsanda SOD'un iki tipi bulunmaktadır. Bunlardan biri sitozolde dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn SOD) halde bulunurken diğeri de mitokondride bulunan tetramerik Mn içeren izoenzimlerdir (MnSOD). Genellikle hücrede en çok bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD' dur. Her iki SOD' un katalizlediği reaksiyonlar aynıdır. SOD' un fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerinden korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır. Normal metabolizma sırasında hücreler bol miktarda süperoksit üretirler fakat SOD sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyleri düşüktür (Akkuş, 1995).



CAT, 4 tane HEM grubu bulunan bir hemoproteindir. OH- oluşumunu önlemek için H₂O₂'yi O₂ ve H₂O'ya ayırıştırır (Akkuş, 1995; Şener ve Yeğen, 2009). Peroksidaz aktivitesinin yanında, bu enzim bir molekül H₂O₂'yi elektron vericisi olarak, diğer H₂O₂'yi de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Peroksizomlarda ve az miktarda da sitosol ve mikrozomal fraksiyonlarda bulunur (Akkuş, 1995; Şener ve Yeğen, 2009). CAT; H₂O₂, metil/etil-hidroperoksidleri gibi küçük molekülleri indirger fakat lipid hidroperoksidleri gibi büyük moleküllere etki etmez (Akkuş, 1995).



Gpx, hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumludur. GSH'ın -SH grubundan, su oluşturmak için hidroksil radikali ya da hidrojen peroksitle birleşmek üzere hidrojen çıkartmasını sağlar (Akkuş, 1995; Şener ve Yeğen, 2009). Tetramerik, 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzim olan Gpx'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte solunum sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Gpx aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve ağır hücre hasarlarına yol açar (Akkuş, 1995; Şener ve Yeğen, 2009).



2.4.2.2. Enzim olmayan endojen kaynaklı antioksidanlar

Melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, albumin vb. moleküller yer alır (Basım, 2005; Şener ve Yeğen, 2009).

2.4.3. Eksojen kaynaklı antioksidanlar

Vitaminler, bazı ilaçlar ve gıda antioksidanları bu grupta yer alırlar (Şener ve Yeğen, 2009).

2.4.3.1. Vitaminler

α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat) bu grupta yer alır (Şener ve Yeğen, 2009).

2.4.3.2. Bazı ilaçlar

Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenylene iodonium), rekombinant süperoksit dismutaz, trolox-C (vitamin E analogu), endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (glutatyon peroksidaz aktivitesini artıranlar, ebselen, asetilsistein), nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin), demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin), nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1), barbitüratlar ve demir şelatörleridir (Akkuş, 1995; Şener ve Yeğen, 2009).

2.4.3.3. Gıdalardaki antioksidanlar

Butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), sodium benzoate, ethoxyquin, propylgalate, Fe-superoxyde dismutase olarak sayılabilir (Akkuş, 1995).

Antioksidan savunmada öncelikle enzimatik antioksidanlar etkilidir (Ozan, vd., 2004). Hastalıkların tedavisi üzerine yapılan çalışmalarda, beslenme sırasında alınan antioksidan etkili maddelerin oksidatif strese sebebiyet veren SOR' ların ve RNS' lerin hücrelere verdiği zararları önemli ölçüde engelleyebildiği belirtilmiştir (Çakan, vd., 2007).

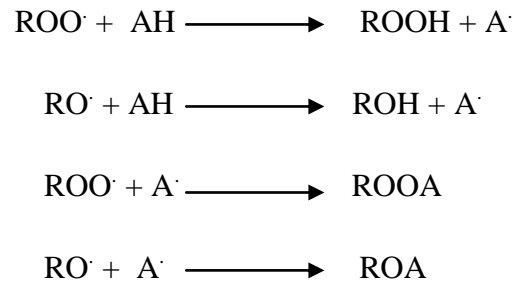
2.5. Fenolik Maddeler ve Gallik Asit

Birçoğu kuvvetli antioksidan özellik gösteren polifenoller bitkisel kaynaklı bileşikler olup hayvanlar tarafından sentezlenememektedir (Peterson and Dwyer, 1998). Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarından olup bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir (Tunalıer, vd., 2002). Bir hidroksil grubu içeren aromatik bir halkaya sahip geniş bir madde grubuna fenolik bileşikler denilmektedir (Kefeli, et al., 2003). Bitkilerin ikincil metabolitleridir (Labiencic and Gabryelak, 2006). Fenolik maddeler ya bitki vakuollerinde birikirler (Kefeli, et al., 2003) ya da bitki hücre duvarlarında lignin ile polimerize halde bulunurlar (Morton, et al., 2000 b).

Özellikle meyve ve sebzelerin rengi, lezzeti ve dayanıklılığı üzerine etkili olup şimdiye kadar yapılan birçok çalışmada polifenollerin serbest radikal tutucu özellikleri

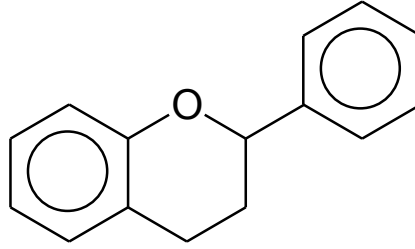
sayesinde ödem giderici, antialerjik, antikanserojen, antimitojen, antinflamatuar veya antimikrobial etki göstererek insan sağlığı açısından yararlı olduğu vurgulanmıştır (Peterson and Dwyer, 1998; Yıldız ve Baysal, 2003; Galati and O'Brien, 2004). Besinlerde, kolaylıkla oksitlenebilen maddeleri oksidasyondan korurlar (Tunalier, vd., 2002).

Fenolik maddeler, lipid peroksi (ROO \cdot) ve alkoksi (RO \cdot) radikalini parçalayıp lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktadır. Son radikal stabil olmak veya zincir reaksiyonu ile hızlı bir tepkimeye maruz kalmak zorundadır, aksi halde zincir reaksiyonları yayılır. Bu stabilizasyon molekül içindeki hidrojen bağlarının yeniden şekil alması ile sağlanır. (Morton, et al., 2000 b; Burak ve 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 (Ekbul, 2004).

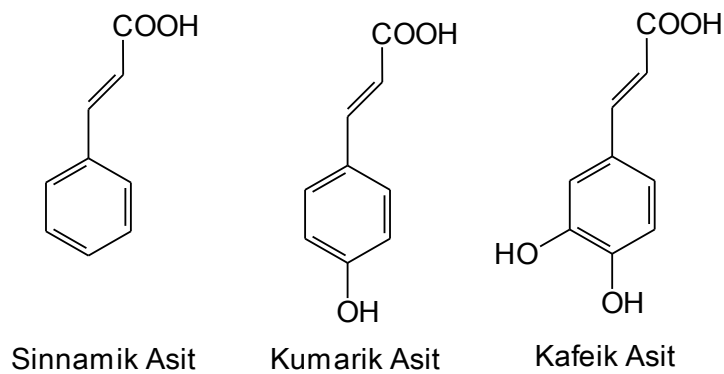
Flavonoidler oksijen içeren bir piren halkasına bağlı benzen halkasından oluşmaktadır (Şekil 2.1). 4000'in üzerinde doğal kaynaklı flavonoid tanımlanmıştır. Flavonoidler piren halkasındaki varyasyonlara bağlı olarak flavonoller, flavonlar, katekinler, antosiyanidinler ve antosiyanidler olarak alt sınıflara ayrılırlar (Ekbul, 2004).



Şekil 2.1 Flavonoidlerin genel yapısı

Fenolik asitler, bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan ve yapılarında bir veya daha fazla hidroksil yapıları aromatik halka bulunduran bileşiklerdir (Şekil 2.2) (Ekbul, 2004).

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 and Toledo, 2004).



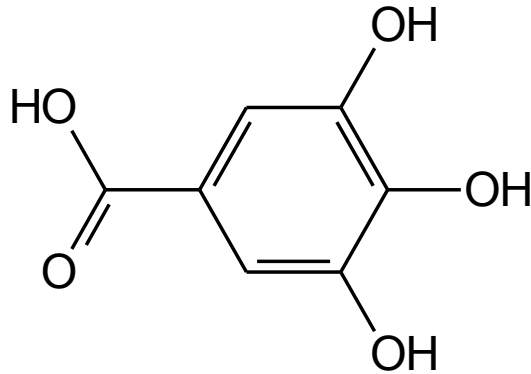
Şekil 2.2 Bitkisel kaynaklı bazı fenolik asit çeşitleri

Fenolik asitlerin serbest radikaller ile redoks döngüsüne katılıp hidrojen alıcısı olarak görev yapabildikleri ve metal iyonlarının, güçlü metal şelatörleri olmaları sayesinde de antioksidan aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir (Marwah, et al., 2007). Bir fenolik asit olan gallik asitin bu biyolojik fonksiyonları sayesinde serbest radikallerin neden olduğu hastalıkların oluşmasını engelleyebildiği veya erteleyebilecekleri düşünülmektedir.

Son yıllarda yapılan birçok çalışma; kalp, karaciğer, beyin, barsak ve böbreklerde oksidatif stres kaynaklı hastalıkların bazı doğal antioksidanlar ile belli ölçülerde önlenbildiğini göstermektedir (Kahraman, et al., 2003). Bu gibi bitkisel ürünlerin koruyucu ya da tedavi edici etkileri bu ürünlerin içeriğinde yer alan flavonoidler, antosiyaninler ve fenolik bileşikler sayesinde olabileceği düşünülmektedir (Sanchez-Moreno, et al., 1998).

Marwah ve arkadaşları (2007) redoks özellikleri sayesinde bitki kökenli antioksidanların (fenolik asit, kateşin, flavonoidler vs.) SOR'un yakalanmasında ve etkisiz hale getirilmesinde önemli rol oynadıklarını rapor etmiştir.

Gallik asit (3,4,5-trihidroksi benzoik asit) bitkilerde doğal olarak bulunan fenolik asit çeşitlerinden birisidir (Lu, et al., 2006). Siyah çay, yeşil çay, üzüm, vişne, ahududu ve patates gibi pek çok bitkide fenolik asit doğal olarak bulunmaktadır (Morton, et al, 2000 a; Gramza and Korczak, 2005). En çok çay bitkisinin yaprağında bulunur ve bu bitkinin sıcak su infüzyonu ile ekstre edilir. Ayrıca; meşe türleri (*Quercus robur*, *Quercus alba*, *Quercus rubra*), kestane (*Castanea sativa*) gibi bir çok ağaç formundan da elde edilebilir (Eyles, et al., 2004; Muruganathan, et al., 2005).



Şekil 2.3 Gallik asidin kimyasal formülü

Yapılan çalışmalarda gallik asidin antibakteriyel, antifungal ve güçlü bir antikanser etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Sakaguchi, et al., 1998; Akiyama, et al., 2001; Pellegrina, et al., 2005). Güçlü antioksidan etkiye sahip olan gallik asit birçok farmakolojik ve biyokimyasal olaylarda etkin antiinflamatuvar, hipolipidemik, antimutajenik, antiatherosklerotik aktiviteye sahiptir (Kroes, et al., 1992; Kim, et al., 2002; Janga, et al., 2008; Yang, et al., 2008). Sakaguchi ve arkadaşları (1998) gallik asitin antikanser aktivitesi üzerine çalışmışlar ve insan promiyelostik lösemi, sıçan hepatoma, insan epitelyal karsinoma, insan hepatoma hücreleri üzerinde denediklerinde kanser hücrelerinin gallik asite oldukça duyarlı olduğunu görmüşlerdir.

Ayrıca antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle lipid peroksidasyonu hasarlarının azaltılmasında da etkin rol oynamaktadır (Shahrzad, et al., 2001). Chanwitheesuk ve arkadaşları (2007) *Caesalpinia mimosoides* Lamk. (Leguminosae)' den elde edilen farklı ekstratların, insanlarda hastalığa neden olan 8 bakteri ve 6 fungal test mikroorganizması üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Test edilen mikroorganizmalar üzerinde en fazla etanolik ekstraktının etkili olduğu ve bu ekstraktın yüksek oranda gallik asit içerdiği belirlenmiştir. Yılmaz ve Toledo (2004) yaptıkları in

vitro bir çalışmada ise gallik asitin E ve C vitaminlerine oranla çok daha büyük bir oranda yüksek LDL oksidasyonunu engelleyerek hücreleri koruduğunu belirlemişlerdir. Bu da gallik asitin kalp hastalıkları, ateroskleroz gibi hastalıklara karşı koruyucu olduğunu göstermektedir.

Gallik asit ve esterlerinin antioksidan özelliklerinden dolayı besin endüstrisinde (E-310, propyl gallate; E311, octyl gallate) ve ilaç sanayisinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanıldıkları rapor edilmiştir (Fuiza, et al., 2004).

Gallik asitin, güçlü antioksidan özellik göstererek, hücreleri koruduğu belirlenmiştir. Ayrıca Yılmaz ve Toledo (2004) gallik asitin NO⁻ varlığında DNA ipliğinde oluşan kırıkları azalttığını rapor etmişlerdir. Ancak gallik asitin birçok hastalığın tedavisindeki etkin mekanizması ile ilgili bilgiler oldukça az olduğu gibi, İ/R sonucu oluşan hasarı önlemeye yönelik çalışmalar da azdır. Bu nedenle etki mekanizması araştırılmaya açık doğal bir fenolik antioksidandır (Priscilla and Prince, 2009).

2.6. Karaciğer

Karaciğer 1200-1500 g ağırlığında büyük bir organdır. Çok yumuşak ve esnek bir yapıda olup karın boşluğunun sağ üst kısmında, diyaframın altında bulunur ve kaburga kemikleri tarafından korunur. Karaciğer, diyafram tarafından kalp ve akciğer gibi intratorasik organlardan ayrılmıştır. (Sherlock, 1975; Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Karaciğer ince, sert bir fibröz kapsül olan glisson kapsülü sarıdır. Bu bağ doku damar ve sinir kolları ve karaciğer parankimi için iç destekleyici bir yapı sağlar. Ayrıca

bu kapsül karaciğerin sağ ve sol loblarını oluşturur. Sağ lobun posterior (arka) yüzeyinde caudate (kaudat) lob, inferior (alt) yüzeyinde quadrate (kuadrat) lob yer alır. Sıçanlarda bunlara ek olarak kuyruk lobu da bulunmaktadır. Lobların her biri de lobüllere ayrılır. Karaciğerin fizyolojik birimleri; silindirik yapıda, çapı 0,8-2 mm ve boyu birkaç mm olan bu lobülleridir. Karaciğer lobülü vasküler ve biliyer damarlar ve bağ dokusu ile ayrılmış polihedral (çok yüzlü) yapıda bir dokudur. Her lobülün merkezinde bulunan sentral ven hepatik venlere açılır. Lobüller arasında bulunan portal üçlü; hepatik arter ve portal ven ile safra kanallarından oluşmaktadır. Bu bölgelerde karaciğere ulaşan arter ve ven kanı hepatositler arasındaki sinusoidler aracılığıyla sentral vene dökülür. Buradan da hepatik venler sayesinde inferior vena cavaya boşalır. Kan akımı periferden merkeze doğrudur (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

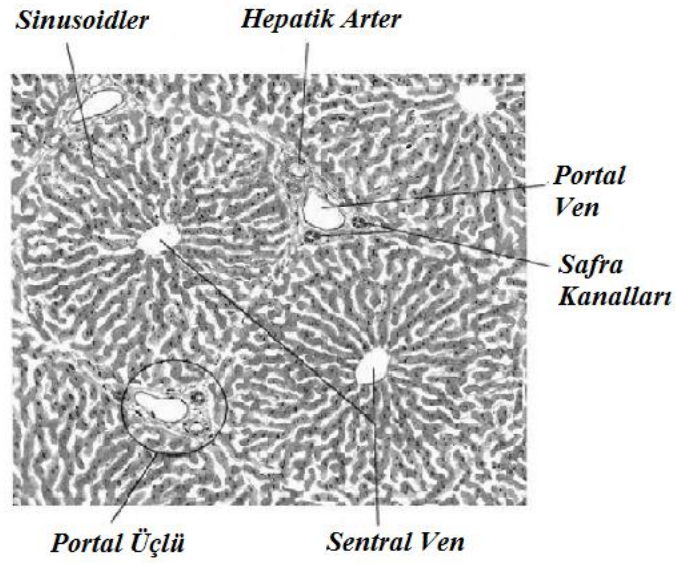
Karaciğere kan iki yerden sağlanır:

- Sindirim sisteminden emilen besin maddelerince zengin venöz kanı karaciğere taşıyan portal ven (Şekil 2.4),
- Merkezi dolaşımdan karaciğere bolca oksijenlenmiş kanı taşıyan hepatik arter (Şekil 2.4) (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Lenfatik damarlar porta hepatis yakınındaki küçük lenf bezleri içerisinde sonlanır (Sherlock, 1975).

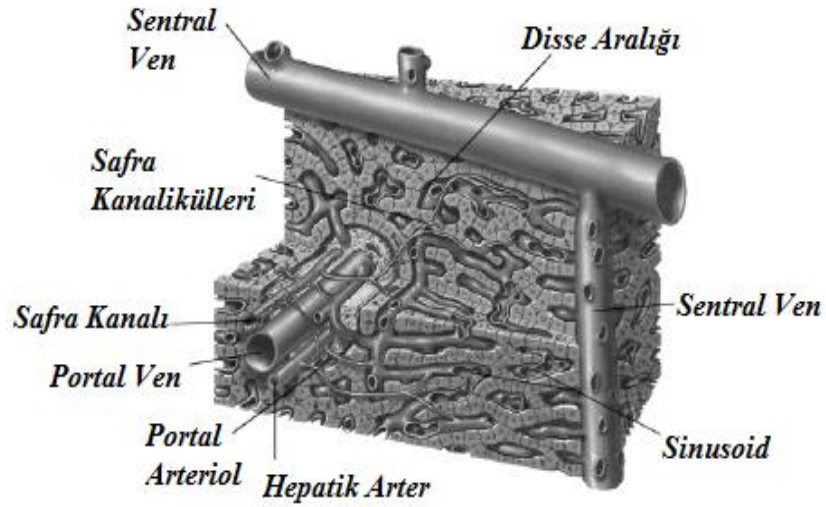
Tek tabakalı, parankimal epitel hücreleri sentral venden çıkıp yayılırlar. Karaciğer hücre tabakalarının her iki tarafına da kan taşıyan vasküler kanallar ise sinusoidlerdir (Şekil 2.4). Sinusoidler sentral ven etrafında zengin, lobüller arası ve vasküler bir ağ oluştururlar. Sinusoidleri endotelyal veya kupffer hücreleri kaplar. Kupffer hücreleri mononükleer fagositik görev yapan hepatik makrofajlardır. Karaciğerin fagositoz özelliği gösteren hücrelerinden biri de NK hücreleridir. Kısa

psödopodları ve granülleri olan bu hücreler karaciğeri çeşitli viral etkenlere karşı korur (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).



Şekil 2.4 Karaciğerde histolojik olarak altıgen yapıda görülen lobüller (Van der Plaats, 2005).

Endotelyal hücreler ile hepatositler arasındaki ve sinusoidler ile çevrelenen doku aralığına Disse aralığı denir (Şekil 2.5). Disse aralığının içerdiği interstisyel sıvı, kan ile hepatosit arasında madde alışverişini sağlar. Disse aralığı sinusoidlere desteklik yapan retiküler fibril içerir ancak bazal lamina içermez (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).



Şekil 2.5 Karaciğerde sinusoidal yapının detaylı görünüşü (Van der Plaats, 2005).

Karaciğer dokusunun yaklaşık %60' ını hepatositler oluşturur. Hepatositler 20-35 μm çapında poligonal (çok köşeli) hücreler olup karaciğerin metabolik fonksiyonlarından ve temel biyokimyasal işlemlerinden sorumludurlar. Hepatositlerin sinusoidlere bakan tarafında, hücre zarı çok sayıda mikrovillus içerir. Bu mikrovilluslar hücrenin atılım ve emilimini artırır (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Hepatosit yüzeyleri; gelen kana doğru akan sinusoidal yüzey (sinusoid ve disse aralığı), sinusoidal yüzeye bitişik hücreler arası yüzey, kanalikular yüzeydir (Burtis and Ashwood, 2005).

Yağ depolayan ito hücreleri ise; karaciğer hasarı sırasında fibroziseneden olan kollajeni sentezleyen fibroblastlara dönüşür. Disse aralığında bulunan ito hücreleri ayrıca kan akışını da düzenler (Burtis and Ashwood, 2005).

Portal akım içindeki toksik maddeler (barsak bakterileri gibi) ve ilaçlar karaciğerde sistemik dolaşıma katılmadan retikuloendotelyal sistem tarafından uzaklaştırılırlar. Ayrıca RES, hemoglobin ve bilirubin metabolizmasında da görev alır. Emilen besinlerin metabolik değişimleri karaciğerde gerçekleşir. Karaciğer fonksiyonlarının gerçekleşmesi yüksek hızda kan akımı ve kan ile karaciğer hücreleri arasında sıkı bir ilişki ile olmaktadır (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Karaciğerin biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları;

- Sekresyon fonksiyonu: safra yolu ile bilirubin atılımı ve bilirubin metabolizması, ksenobiyotik metabolizması ve atılımı,
- Sentez fonksiyonu: albumin, globulin, immunglobulinler, seruloplazmin, transferin, koagulasyon proteinleri, fibronektin, lipoprotein sentezi, karaciğer enzimleri, üre sentezi, kreatin gibi proteinlerin sentezi,
- Metabolik fonksiyon: amonyak metabolizması, karbonhidrat metabolizması, yağ metabolizması, protein metabolizması,
- Depolama fonksiyonu: vitaminlerin depolanması, demir depolanması, glikojen depolanması,
- Sindirim sisteminden kaynaklanan bakterilerin filtre edilmesi,
- Gastrointestinal yolla safra salgılama,
- Barsaktan dönen kannın filtrasyonu (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Karaciğer hastalıklarında hepatositlerde oluşan hasarı ve karaciğer hücre nekrozunu belirlemede kullanılan karaciğer enzimlerinin başlıcaları ALT, AST, alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH) ve γ -glutamat transpeptidaz (GGT)' dir (Sherlock, 1975; Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Aminotransferazlar; aminoasitler ile 2-okzo-asitlerin birbirine çevrilmesini amino gruplarının transferi yolu ile gerçekleştiren enzimlerdir. ALT ve AST hayvan dokularında çokça bulunur. İnsan plazması, safra, BOS ve tükürükte normal olarak bulunurken, böbrekte hasar olmadıkça idrarda görülmez. Değişik dokuların transaminaz aktiviteleri birbirinden farklılık gösterir (Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Amino transferlerinin gerçekleştiği reaksiyonlarda 2-okzoglutarat/L-glutamat ikilisi, amino grubu alıcısı ve vericisi olarak kullanılır. Her enzimin özgülüğü, amino grubu vericisi olarak kullanılan kendi aminoasidinden kaynaklanır. Örneğin; AST enziminin amino grubu vericisi aspartat, ALT enziminin amino grubu vericisi ise alanin aminoasitleridir. Geri dönüşümlü olan AST ve ALT reaksiyonlarında denge sırasıyla aspartat ve alanin oluşumu yönündedir. AST ve ALT ile katalizlenen bu reaksiyonlarda denge, sırası ile aspartat ve alanin oluşumu yönünde gerçekleşir (Burtis and Ashwood, 2005).

Hepatosit ve sinüzoidal boşluk arasında enzimler için yüksek konsantrasyon farkı bulunmaktadır. Hücre hasarı sonucu membran geçirgenliği artarak sitosoldeki enzimler sinüsoidlere ve buradan periferik kana geçerler. Diğer yandan da mitokondri membranlarının geçirgenliği de artar (Sherlock, 1975; Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Hasarlı hepatositlere sahip bireylerde enzim miktarı, normal hepatositlere sahip bireylerden oldukça farklıdır. Kronik karaciğer hastalığı olanlarda karaciğer dokusunda ALT aktivitesi AST aktivitesine oranla daha hızlı azalmaktadır. Bu nedenle hastalık ilerledikçe serumdaki AST oranı ALT' ye göre yükselir. Akut karaciğer hastalığında ALT ve AST' nin intrasellüler aktiviteleri düşüktür. ALT düzeyi, AST düzeyinden yüksektir. Dokudaki bu değişiklikler serumdaki aktivitelere yansımaktadır (Sherlock, 1975; Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

AST, SGOT olarak da adlandırılır. Kalp, karaciğer, iskelet kası ve böbreklerde bolca bulunur. Bu dokular akut olarak hasara uğradığında, bu hücrelerden enzimin salınması ile serum değerleri yükselir. AST' nin %80' i hücrenin mitokondrisinde %20' si sitosolde bulunur. Serumdaki normal seviyesi 5-12 ünite/100 ml' dir (Sherlock, 1975; Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

ALT, SGPT olarak da adlandırılır. Karaciğerde bolca bulunurken, kalpte ve iskelet kasında daha az miktarlarda bulunur. AST ile karşılaştırıldığında ALT miktarı daha azdır. Bu nedenle de ALT' nin serumdaki artışı karaciğerde olan bir hasarı tespit etmede AST' den daha spesifiktir. ALT enzimi hepatosit içinde sadece sitosolde bulunur. Serumdaki normal seviyesi 4-13 ünite/100 ml' dir (Sherlock, 1975; Dilek, 2003; Burtis and Ashwood, 2005).

Renal İ/R hasarında, İ/R' ye maruz kalan bölge dışındaki doku ve organlarda hasar meydana geldiği bilinmektedir. Bu organlar arasında karaciğer önemli yer almaktadır. Bu nedenle çalışmamızda renal İ/R sonucu karaciğerin antioksidan enzim aktivitesi ve histolojisi değerlendirilerek gallik asitin olası koruyucu etkisi araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

Deneysel çalışmamız; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü; Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı, Moleküler Biyoloji ve Toksikoloji Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmamız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu' nun 139/2010 sayılı izni ile yapıldı.

3.1. Deney Hayvanları

Deneysel çalışmamızda sağlıklı, erkek, 200-250 g ağırlıkta, 3-4 aylık, *Sprague dawley* cinsi, albino sıçanlar kullanıldı. Tüm deney hayvanları T.C. Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkez Başkanlığı, Deney Hayvanları Üretim Laboratuvarı'ndan temin edilerek deney süresince 12:12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldı. Deneye başlanmadan önce hayvanların bir hafta ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Bu süre içerisinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslendi ve sıçanlara çeşme suyu verildi.

3.2. Deney Grupları

35 deney hayvanı arasından rastgele seçimle her birinde $n=7$ sıçan olmak üzere toplam 5 grup oluşturuldu (Bkz. Tablo 1). Bu gruplar;

Grup I: Kontrol grubudur ve bu grup hayvanlarına cerrahi ya da enjeksiyon uygulamalarından hiçbiri yapılmadı ancak diseksiyon yapıldı.

Grup II : Her hayvana 1 ml serum fizyolojik enjeksiyonu ve İ/R yapıldı yapıldı.

Grup III : Her hayvana 50 mg.kg⁻¹ tek doz gallik asit enjeksiyonu ve İ/R yapıldı.

Grup IV : Her hayvana 100 mg.kg⁻¹ tek doz gallik asit enjeksiyonu ve İ/R yapıldı.

Grup V : Her hayvana 200 mg.kg⁻¹ tek doz gallik asit enjeksiyonu ve İ/R yapıldı.

Grup I'e ait deney hayvanlarına herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadan diseksiyon yapıldı. Diğer gruplara ait deney hayvanlarına ise sağ böbrek nefrektomi işlemi uygulanıp 15 gün iyileşmenin olması beklendi. 45 dakikalık iskeminin ardından 6 saat reperfüzyon uygulandı (Sener, et al., 2005). Reperfüzyonun bitiminde eter anestezisi altında diseksiyon gerçekleştirildi.

3.3. Gallik Asit Uygulaması

Gallik asit ticari olarak (Sigma, S0292) temin edildi. Deneylerimizde gallik asitin 3 farklı dozu (50, 100 ve 200 mg.kg⁻¹) 7 gün boyunca günde 1 kez olmak üzere, günlük ve taze olarak uygulandı. Gallik asit dozları; 1 ml %0,9 steril serum fizyolojik ile çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirildi. Kimyasal madde enjeksiyonları, çözeltilerin taze olarak hazırlanmasından sonra, steril tek kullanımlık enjektörler ile tek doz olarak periton altına uygulandı.

3.4. Anestezi ve Cerrahi İşlemler

3.4.1. Nefrektomi İşlemleri

Tüm cerrahi işlemler steril ortamda ve steril cerrahi aletler kullanılarak gerçekleştirildi. Diürinal hormonal değişimlerin sıçanlar üzerine olası etkileri dikkate alınarak 09.00 ile 12.00 saatleri arasında nefrektomi işlemi yapıldı (Assy, et al., 1998; Karabelyos, et al., 1999; Kaya, et al., 2002; Akino, et al., 2005).

Nefrektomi işlemi; deney hayvanlarına, intramuskular olarak 10 mg.kg⁻¹ ksilazin ve 70 mg.kg⁻¹ ketamin anestezisi altında (Kuliscic, at al.,2004; Aydoğdu, vd., 2005), sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasında rektal ısı kontrolü yapılarak gerçekleştirildi. Cerrahi uygulama bölgesinin %70' lik etil alkol ile temizliği yapıp sağ böbrek nefrektomisi gerçekleştirildi (Waynforth and Flecknell, 1994) ve 15 gün süre ile iyileşmeleri beklendi (Sener, et al., 2005).

Her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verildi (Kaya et al., 2002). Bu işlemi takiben, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütünle dikilerek kapatıldı ve poviodeks antiseptik solusyon ile laparotomi bölgesi temizlendi. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak diyet değişikliği yapılmaksızın 15 gün boyunca yaşatıldı.

3.4.2. İ/R İşlemleri

Böbrekleri alınan ve 15 gün iyileşmeleri beklenen, İ/R yapılacak deney hayvanlarına intramuskular olarak 10 mg.kg⁻¹ ksilazin ve 70 mg.kg⁻¹ ketamin anestezisi uygulandı (Kulisic, et al.,2004; Aydoğdu, vd.; 2005) ve midline laparotomi gerçekleştirildi. Sol renal arter izole edilerek, antitratmatik vaskular klemp yardımıyla 45 dakika süre ile sol renal arterden kan akışı durduruldu. 45 dakika iskeminin hemen ardından 6 saat reperfüzyon uygulandı (Sener, et al., 2005).

Reperfüzyon süresince her bir hayvana yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verildi (Kaya, et al., 2002). Bu işlemi takiben, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek suturele dikilerek kesi bölgesi kapatıldı ve poviodeks antiseptik solusyon ile laparotomi bölgesi temizlendi. Cerrahi işlem görmüş her bir deney hayvanı kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı yerleştirilerek 6 saatlik reperfüzyon süresi boyunca yaşatıldı.

3.5. Doku Örneklerinin Alınması ve Değerlendirilmesi

Deney gruplarına ait hayvanlar hafif eter anestezisi altında, intrakardiyak olarak bütün kanın alınması yoluyla öldürüldü.

3.5.1. Serum örnekleri

Kan örnekleri, Eppendorf marka, 5804 R model santrifüj cihazı ile 10 dakika 3000 rpm devirde santrifüjlenerek serumlar elde edildi (Sanz, et al., 1998; Aktay, et al.,

2000; Theocharis, et al., 2001). Polietilen tüplere aktarılan serum örnekleri biyokimyasal analizler için -80°C derin dondurucuda korundu (Furuta, et al., 2000).

Karaciğer hücrelerinin olası fonksiyon bozukluğunu tespit etmek amacıyla biyokimyasal olarak serum örneklerinde AST ve ALT enzimlerinin seviyeleri belirlendi (Aoki, et al., 2001; Kaya, et al., 2002). ALT ve AST ölçümleri HITACHI-917 oto analizatörü ile Human (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden Germany) marka ticari kitler kullanılarak yapıldı.

3.5.2. İstatistiksel Değerlendirmeler

Elde ettiğimiz ALT ve AST ölçümlerinin değerlendirilmesinde SPSS 12.0 for Windows paket program ile One Way Anova-Tukey testi kullanıldı. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal olarak ortaya çıkan değer (P) açısından gruplar karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklar $P < .05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

3.5.3. Karaciğer doku örnekleri

Tüm gruplarda intrakardiyak kanın alınmasından hemen sonra her bir hayvana ait karaciğer çıkarılıp serum fizyolojik ile hızlı bir şekilde yıkandı. Karaciğer dokusu iki kısma ayrılarak birinci kısım histolojik analizler için %10' luk nötral formaldehit fiksasyon sıvısına alındı. İkinci kısım karaciğer örnekleri ise enzim aktivitelerinin belirlenmesi için -80°C derin dondurucuda saklandı.

3.5.3.1. Karaciğer doku örneklerinin histolojik analizleri

Hızlı bir şekilde %10' luk nötral formaldehit tespit çözeltisine alınan karaciğer doku örneklerinin 24 saat süre ile fiksasyonu sağlandı. Tüm gruplarda kimyasal fiksasyonu tamamlanan karaciğer dokularına histolojik takip işlemleri uygulandı ve parafin blokları hazırlandı. Etil alkol serisinde sırasıyla 1'er saat %70, %80, %90(1), %90(2), %96(1), %96(2) ve 30 dakika absöü etil alkolden geçirilerek dehidratasyon sağlandı. 30'ar dakika 2 kez ksilol uygulamasıyla dokuların şeffaflanması sağlandı. Dokular parafinizasyon için 57°C etüvdeki 3 ayrı parafinde (paraplast plus Sigma P3683) sırasıyla 30, 60, 60 dakika sürelerle bekletilerek bloklandı. Bu bloklardan standart H&E boyama ve immunohistokimya uygulaması yapılmak üzere mikrotom (Leica RM 2025) kullanılarak 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak Poly-L-Lysine kaplı lamlar üzerine tespit edildi. Kesitlerin bir kısmı 37°C etüvde 1 gece bekletildi ve daha sonra ksilolde deparafinize edildi. Derecesi azalan etil alkol serilerinde hidratasyonu sağlanarak H&E boyamaları yapıldı. H&E boyanmış karaciğer preparatları ışık mikroskop düzeyde histopatolojik olarak incelendi. Değerlendirmelerde gruplara göre skorlama yapıldı.

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

İmmunhistokimyasal boyama işlemi uygulanmış karaciğer doku kesitlerinde de tüm kesit alanları mikroskopik olarak incelenerek iNOS içeriği belirlendi. Değerlendirmelerde gruplara göre skorlama yapıldı.

3.5.3.2. Karaciğer doku örneklerinin biyokimyasal analizleri

Böbrek iskemisi yapılmış ratları bir antioksidan olan gallik asit ile tedavi ettikten sonra karaciğerden homojenize ettiğimiz SOD, CAT ve Gpx izoenzimlerinin enzim aktivitesinin belirlenmesi için Doğal Jel Elektroforezi ile çalışıldı (Jayakumar, et al., 2007).

i-Homojenizasyon:

-80°C' de saklanan karaciğer parçaları bağ dokusu ve yağlardan iyice temizlendi ve küçük parçalara ayrıldı. Dokular, 1 g doku başına 2-3 hacim soğuk ekstraksiyon tamponu (KCl) ile 5 vuruşta parçalandı. Bu amaçla kullanılacak araç, doku miktarına göre seçildi. Genelde yağ ağırlığı 30 g altındaki yumuşak dokular porselen havanda ezilerek, daha ağır olanlar ise karıştırıcı homojenizatörde karıştırılarak homojenize edildi. Homojenat 10-15 dakika çalkalandı. 6030 rpm' de 15-60 dakika santrifüjledikten sonra üst sıvı (süpernatant) cam yüzünden süzülerek yağ partikülleri uzaklaştırıldı.

Homojenatlar ependorf tüplerine bölünerek, Doğal (Native) Jel Elektroforezi' nde kullanılmak üzere -80°C' de saklandı.

ii-Lowry yöntemi:

Doğal Jel Elektroforezi kullanılarak aktiviteleri belirlenecek olan CAT, SOD ve Gpx izoenzimlerinin total protein miktarları ayrıca 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 çözeltilerde, oda sıcaklığında 5-10 dakika içinde tamamlanır. Folin belirtecindeki molibden ve tungsten ile birleşerek yeni bir kompleks ortaya koyan bakır ile yöntemin duyarlılığı 3-15 kat arttırıldı. 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.

iii-Doğal jel elektroforezi:

Doğal jel elektroforezi, SDS çözeltileri konmadan ve örnekler elektroforez öncesi kaynatılmadan, karaciğer örnekleri üzerinde ilk olarak Laemmli tarafından 1970 yılında yapıldı. Doğal jel elektroforezinde kullanılan tamponlar, deterjan ve diğer denatüre edici maddeleri içermediğinden, prosedür doğal koşullarda gerçekeştirildi. Tüm çözeltiler deiyonize saf su ile hazırlandı. Tris içeren tamponlar 'trizma base' ile hazırlanıp pH' ları HCl ile ayarlandı (Temizkan ve Arda, 2004).

A) Alt tank tamponu (63 mM Tris, 0.05 N HCl, pH 7.5)

Tris.....22.7 g

1N HCl.....150 ml

H₂O.....3 l'ye tamamlandı.

B) Üst tank tamponu (37.6 mM Tris, 40 mM glisin, pH 8.9)

Tris.....4.56 g

Glisin.....3 g

H₂O.....1 l'ye 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, 0.256 N 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 AP, %0.002 riboflavin fosfat)

%10 AP.....0.6 ml

% 0.02 Riboflavin fosfat.....10 ml

H₂O.....100 ml'ye tamamlandı.

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

Sükroz.....5 g

% 1 Bromofenol mavisi.....1 ml

H₂O.....100 ml'ye tamamlandı.

Ayırma jeli hazırlanırken, monomer (akrilamid) ve çapraz bağlayıcı (bisakrilamid) yüzdelerinden hesaplanan %T ve % C_{bis} oranları göz önünde bulundurularak monomer, tampon, TEMED ve su 50 ml' lik bir erlende 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 düzgünleştirmek için butanol çözeltisi kullanıldı. Polimerizasyondan sonra butanol çözeltisi dökülerek jel, birkaç kez distile su ile yıkandı (Temizkan ve Arda, 2004).

Yükleme jeli hazırlanırken, monomer, tampon ve TEMED bir erlende karıştırıldı ve polimerizasyon başlatıcı eklendi. Ayırma jelinin üzerine 0.3 ml olacak şekilde yüklemeye jeli eklendi. Örnek uygulama kuyucuklarının oluşumunu sağlayan tarak, hava boşluğu kalmayacak şekilde, yüklemeye jelinin içine yerleştirildi. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı. 10 hacim örnek ile 1 hacim sükröz-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 l 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 yürüdüktan sonra işlem durduruldu. Saptama yöntemleri kullanılarak analiz tamamlandı (Temizkan ve Arda, 2004).

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

Çalışmamızda CAT aktivitesinin belirlenmesi Woodbury ve arkadaşlarının (1971) metoduna göre yapıldı. Proteini yürüttüğümüz % 8'lik jel, 5 mM H₂O₂ solusyonunda 10 dakika bekletilip yıkandıktan sonra % 1'lik potasyum ferrik siyanid ve % 1'lik ferik kloridden oluşan reaksiyon karışımına konup, jel boyanana kadar beklendi. Koyu yeşil zeminde CAT aktivitesi gösteren protein bantları sarı renkte boyandı. Yürütme işlemi 170 V, 80 mA' da 1 saat yapıldı.

Karaciğer dokusundaki SOD aktivitesinin belirlenmesi ise Beauchamp ve Fridovich (1971) metoduna göre yapıldı. Proteinleri yürüttüğümüz % 10' luk jeli, içerisinde 10 mg NBT, 1 mg EDTA ve 2 mg riboflavin olan 50 mM Tris-HCl (pH:8.0) tamponunda karanlıkta 30 dakika bekletildi. Daha sonra jel beyaz ışıkla incelendiğinde

mavi-menekşe zemin içerisinde SOD aktivitesi gösteren bantlar şeffaf olarak gözlemlendi. Yürütme işlemi 200 V, 80 mA' da 2 saat yapıldı.

Gpx izoenziminin aktivitesinin belirlenmesinde Lin ve arkadaşlarının (2002) metodu kullanıldı. Proteinleri yürüttüğümüz % 10' luk jeli, içerisinde 200 mg glutatyon ve %30 H₂O₂ 50 ml, 50 mM Tris-HCl tamponunda (pH: 8.0) 30 dakika beklettikten sonra, aynı jeli içerisinde 25 mg NBT ve 25 mg PMS bulunan 50 mL 50 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8) aktarıldı. Gpx izoenzim aktivitesi gösteren bantlar beyaz renkte gözlemlendi. Yürütme işlemi 200 V, 80 mA'de 2 saat yapıldı.

Bütün deney gruplarına ait hayvanların karaciğer dokularındaki CAT, SOD, Gpx enzim aktiviteleri sonucu jelde ortaya çıkan bantlar Kodak Gel Logic 1500 Imaging System Jel görüntüleme sisteminde Kodak Molecular Imaging Software paket programı kullanılarak fotoğraflandı. Jel üzerinde enzim aktiviteleri sonucu oluşan bölgelerin alanları sayısal olarak ölçüldü. Bu alanlar deney grupları arasında karşılaştırıldı.

4. SONUÇLAR

4.1. Biyokimyasal Analizler

4.1.1. Serum örneklerinde biyokimyasal analizler

Grup I, II, III, IV ve V'teki deney hayvanlarına ait kan serumlarının biyokimyasal analizlerinden elde edilen ALT ve AST miktarları gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

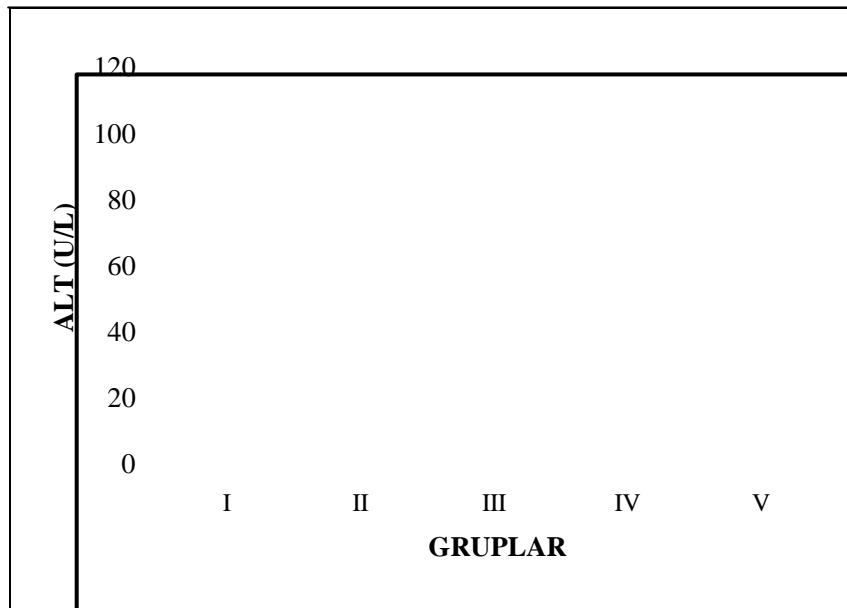
Çizelge 4.1 Deney gruplarına ait hayvanların kan serum örneklerinde belirlenen ALT ve AST miktarlarının Ortalama değerleri \pm Standart hata değerleri (n=7).

Gruplar	ALT (U/L)	AST (U/L)
I	42,04 \pm 0,73	101,41 \pm 2,01
II	92,04 \pm 1,70 ^a	364,58 \pm 11,83 ^a
III	95,35 \pm 1,04 ^a	313,88 \pm 11,24 ^{ab}
IV	75,60 \pm 2,45 ^{ab}	294,25 \pm 16,75 ^{ab}
V	71,58 \pm 3,61 ^{ab}	259,62 \pm 8,67 ^{ab}

P< .05 **a:** Grup I' den; **b:** Grup II' den anlamlı fark vardır.

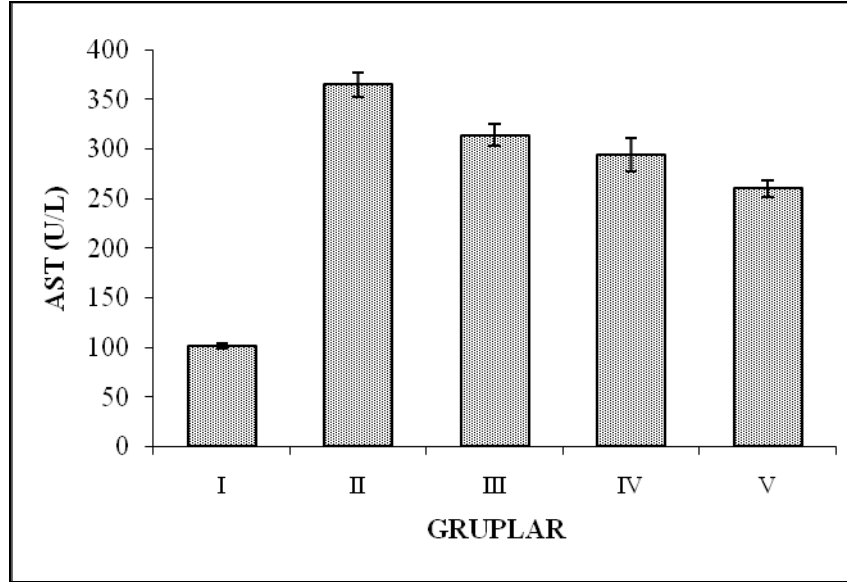
Buna göre, serum ALT seviyeleri ele alındığında Grup II, III, IV ve V'in Grup I'den (P< .001) istatistiksel olarak önemli fark gösterdiği bulundu. Grup II ile III arasında fark bulunamamış olmasına karşın Grup IV (P< .001) ile V (P< .001)' in

istatistiksel değerlendirmede Grup II ile III'den aynı önemde fark gösterdiği saptandı. Ancak, Grup IV ile Grup V arasında serum ALT seviyesi bakımından istatistiksel anlamda fark gözlenmedi (Şekil 4.1).



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

Serum AST seviyeleri ele alındığında Grup II, III, IV ve V' in Grup I' den ($P < .001$) istatistiksel olarak önemli fark gösterdiği bulundu. İ/R yapılmış ve tedavi için gällik asitin sırasıyla 50, 100 ve 200 mg.kg^{-1} uygulandığı Grup III ($P < .05$), IV ($P < .01$) ve V ($P < .001$)' in Serum fizyolojik + İ/R grubundan (Grup II) istatistiksel olarak gösterdiği farkın öneminin sırasıyla oransal olarak olumlu şekilde arttığı bulundu. Ayrıca, Grup V ($P < .05$)' in de Grup IV'den istatistiksel olarak olumlu yönde fark gösterdiği belirlendi. Ancak, Grup IV' ün Grup III ve V'den istatistiksel anlamda farkının olmadığı tespit edildi (Şekil 4.2).



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

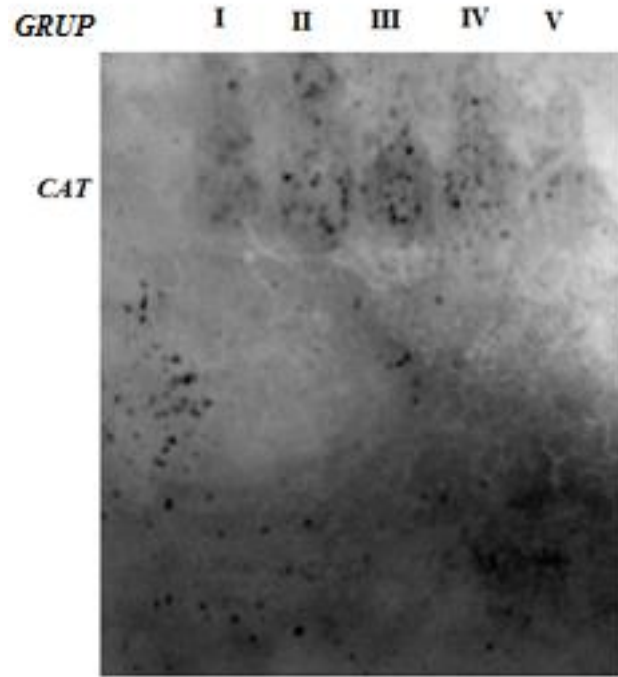
4.1.2. Karaciğer doku örneklerinde elektroforetik analizler

Tüm deney gruplarına ait karaciğer doku örneklerinde Doğal Jel Elektroforez tekniğiyle tespit edilen CAT, SOD ve Gpx enzim aktiviteleri sonucu ortaya çıkan alanlar jel üzerinde görüntülendi ve alanların sayısal değerleri ölçüldü (Çizelge 4.2).

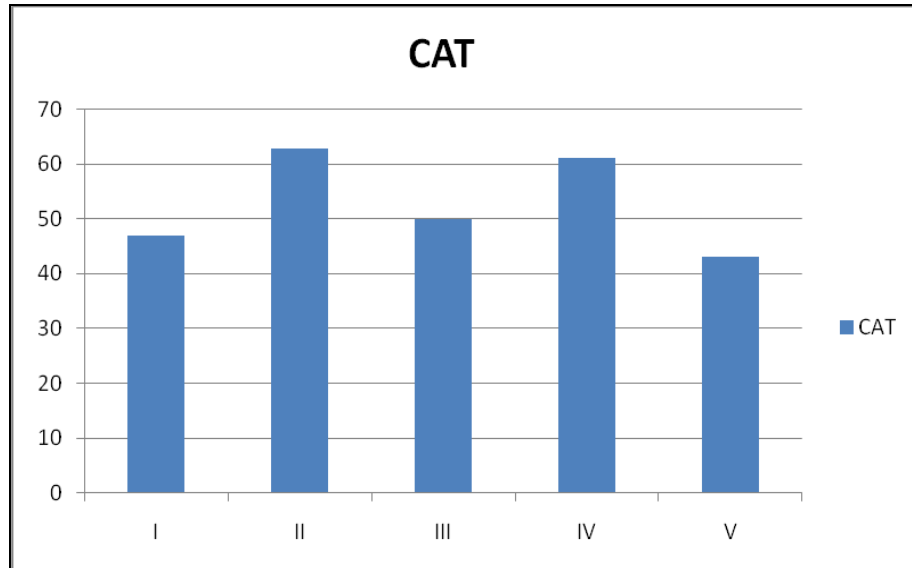
Çizelge 4.2 Karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen CAT, SOD, Gpx enzim aktivitelerinin band alanları (mm²).

GRUPLAR	CAT mm ²	SOD mm ²		Gpx mm ²				
		SOD1	SOD2	Gpx1	Gpx2	Gpx3	Gpx4	Gpx5
I	46,8645	13,9732	10,0426	14,9782	13,7647	9,9744	13,2244	13,1205
II	62,8962	20,1336	15,8193	19,4251	17,2474	14,9948	15,9923	18,9098
III	50,0004	19,9789	16,4104	15,0696	16,6406	10,8804	16,5201	18,7020
IV	61,1540	19,5528	18,4950	16,0172	15,7928	10,4357	14,5626	15,2733
V	43,1021	17,9764	15,3630	14,4462	13,7605	9,4009	13,2992	17,0396

CAT enziminin elektroforetik analiz sonuçlarında tüm gruplarda tek bir band ortaya çıktı. Grup I' e ait karaciğer dokusunda band alanı düşük iken Grup II' de band alanı yüksek bulundu. Grup III' de band alanı Grup I' e yakın iken Grup IV' deki band alanı Grup II' ye yakın ölçüldü. Grup V' te ise band alanının Grup I' den daha da düşük olduğu görüldü (Şekil 4.3; Şekil 4.4).

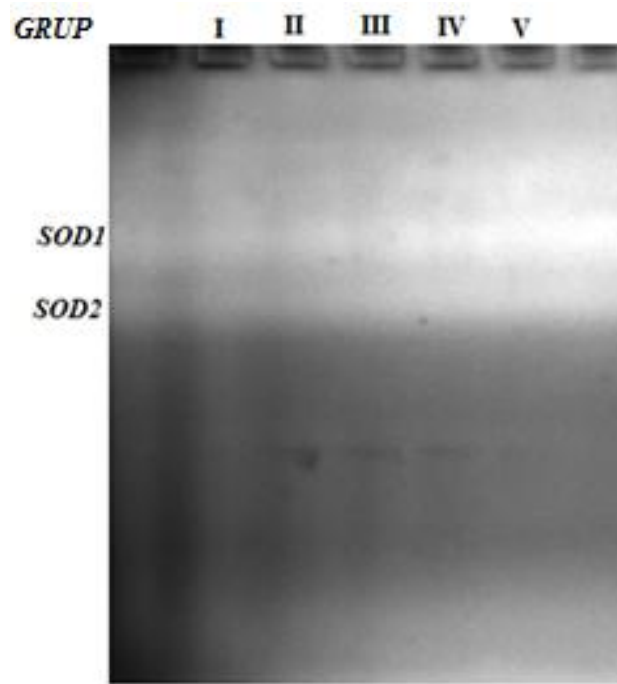


Şekil 4.3 Gruplara ait CAT izoenziminin elektroforetik bantları

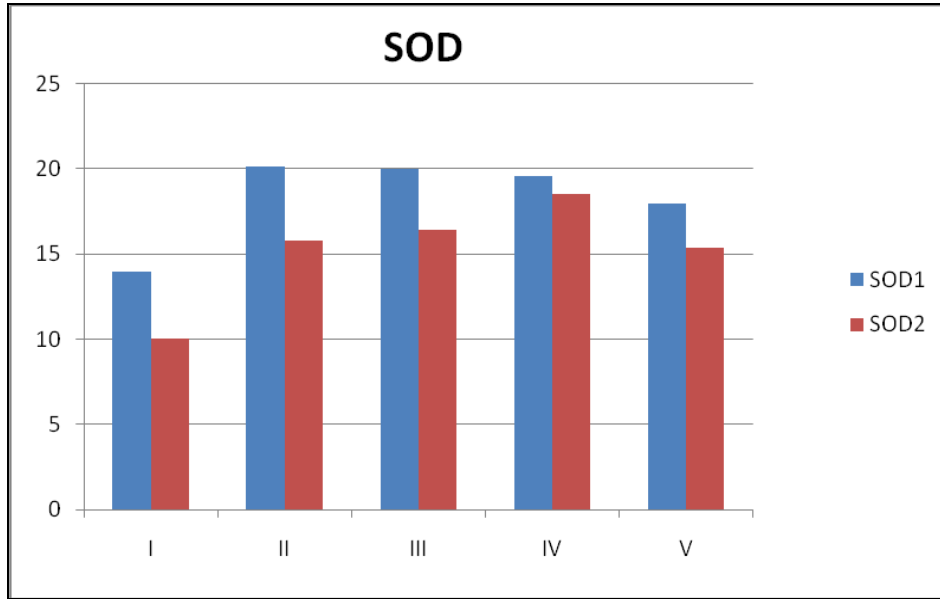


Şekil 4.4 Grup I, II, III, IV ve V'e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen CAT enzim aktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri (mm²).

Karaciğer dokusunda SOD enziminin jel üzerinde belirli alan ölçülerine sahip iki izoformu görüldü. SOD1 izoformunun Grup I' de band alanı düşük bulunurken, band alanı en yüksek Grup II' de bulundu. Grup III, IV ve V' te doz artışına bağlı olarak sırasıyla band alanında düşüş kaydedildi. SOD2 izoformunda ise Grup I' de düşük band alanı, Grup II' de Grup I' e göre daha yüksek band alanı görüldü. Doza bağlı olarak Grup III ve IV' ün band alanında Grup II' den yüksek bir artış tespit edildi. Grup V' te Grup II' ye yakın alan ölçüleri tespit edildi (Şekil 4.5; Şekil 4.6).

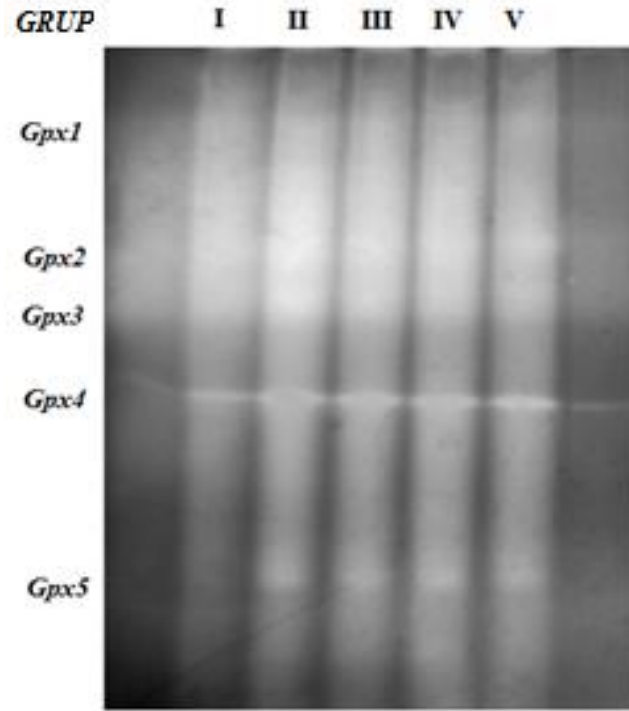


Şekil 4.5 Gruplara ait SOD izoenziminin elektroforetik bandları

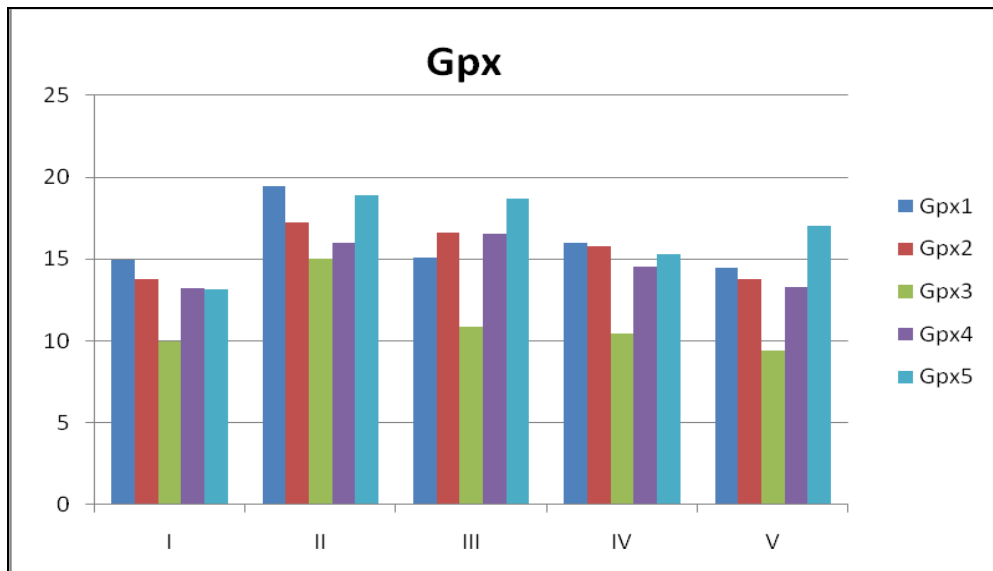


Şekil 4.6 Grup I, II, III, IV ve V' e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen SOD enzim aktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri (mm²).

Karaciğer dokusunda Gpx enziminin; Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4 ve Gpx5 olmak üzere beş izoformu tespit edildi. Gpx'in tüm izoformları Grup I'de düşük band alanları, Grup II'de ise yüksek band alanları gösterdi. Gpx1 izoformunun alanı Grup III ve IV'te doz artışına bağlı olarak sırasıyla artarken, Grup V'te Grup I'e göre bir azalma gözlemlendi. Gpx2 ve Gpx3 izoformlarının alanlarında Grup III, IV ve V'te doz artışına bağlı olarak sırasıyla azalma görüldü. Gpx4 izoformunda Grup III, Grup II'den daha büyük bir alana sahipken; Grup IV ve V'te doz artışına bağlı olarak sırasıyla alanda azalma görüldü. Gpx5 izoformunda Grup III Grup II'ye yakın alana sahipken, Grup IV ve V'te doz artışına bağlı olarak sırasıyla artma görüldü (Şekil 4.7; Şekil 4.8).



Şekil 4.7 Gruplara ait Gpx izoenziminin elektroforetik bandları

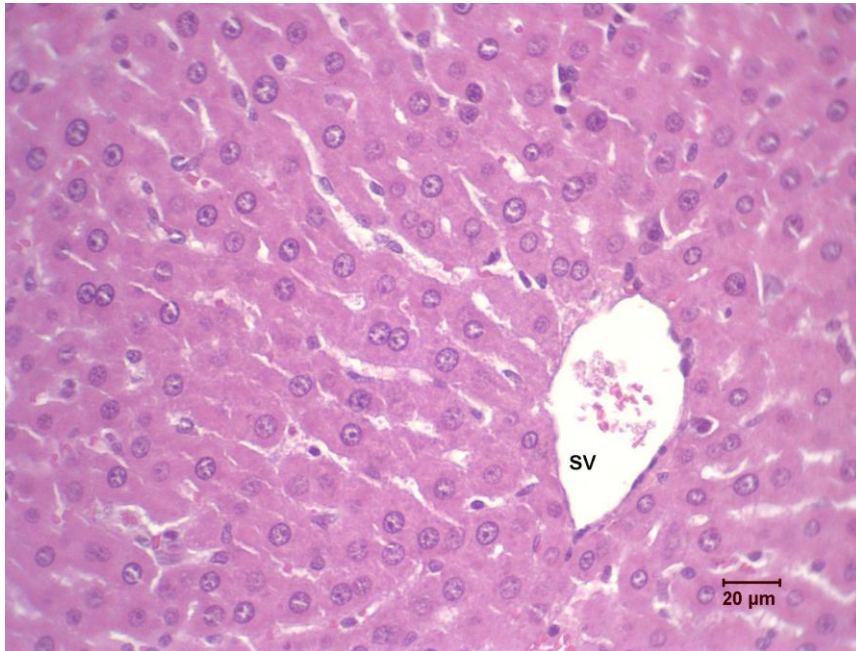


Şekil 4.8 Grup I, II, III, IV ve V' e ait karaciğer dokusu örneklerinde belirlenen Gpx enzim aktivitesi sonucu oluşan band alanlarının ortalama değerleri (mm²).

4.2. Karaciğer doku örneklerinin histolojik analizleri

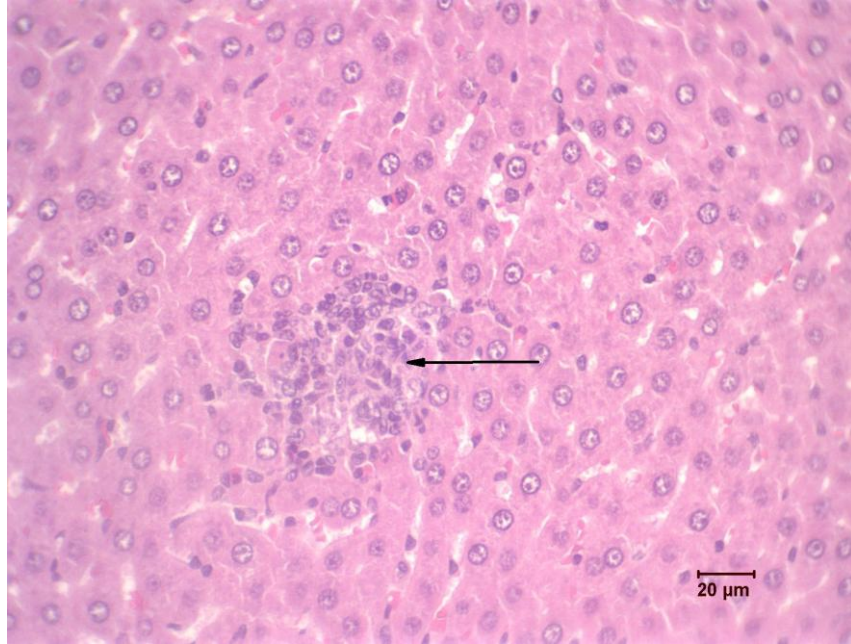
4.2.1. Histolojik analizler

Deneysel çalışmamızda kontrol grubunu teşkil eden Grup I sıçanlarına ait karaciğer doku preparatları incelendiğinde gruba ait örneklerde histolojik olarak herhangi bir doku hasarına rastlanmadı. Hepatositler sentral ven çevresinde ışımsal olarak dizilmiş olup portal alanlarda ve venlerde histolojik yapının korunduğu tespit edildi (Şekil 4.9).

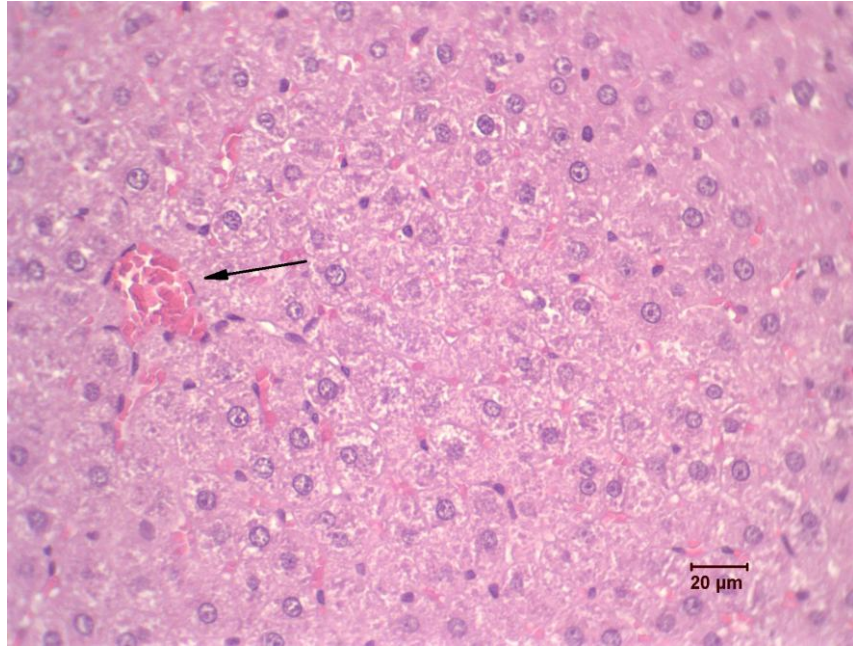


Şekil 4.9 Kontrol grubu (Grup I) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde sentral ven (SV) çevresindeki hepatositler (H&E).

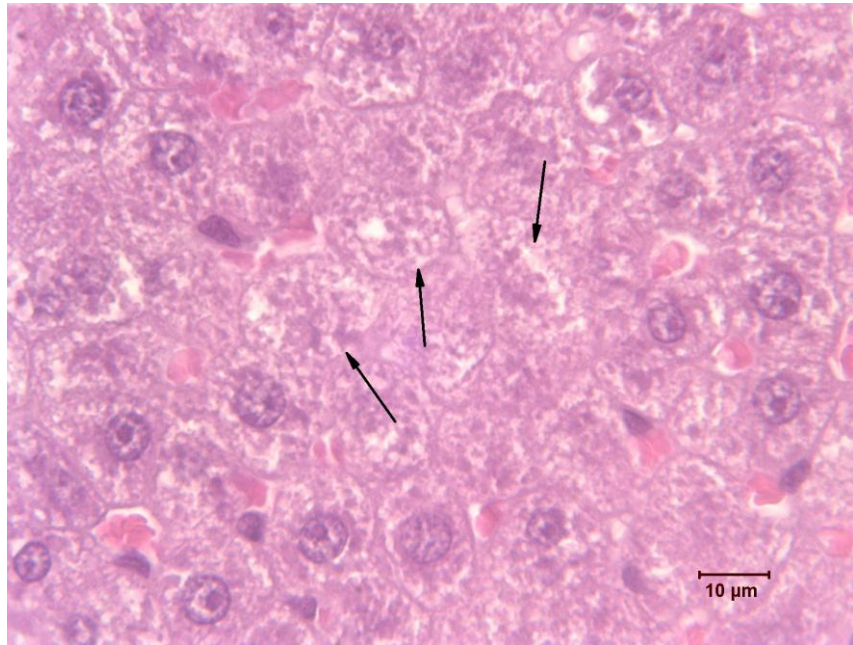
Negatif kontrol olarak değerlendirmeye aldığımız Grup II' ye ait sıçanların karaciğer doku preparatlarında İ/R uzak organ hasarına bağlı olarak dokuda yoğun bir şekilde PMNL göçüne bağlı nükleer infiltrasyon (Şekil 4.10) ve sinusoidlerde yaygın kanama alanları (Şekil 4.11) gözlemlendi. Ayrıca dokuda geniş nekrotik alanlar (Şekil 4.12) ve hepatositlerde yoğun bir şekilde vakuolizasyon saptandı (Şekil 4.13).



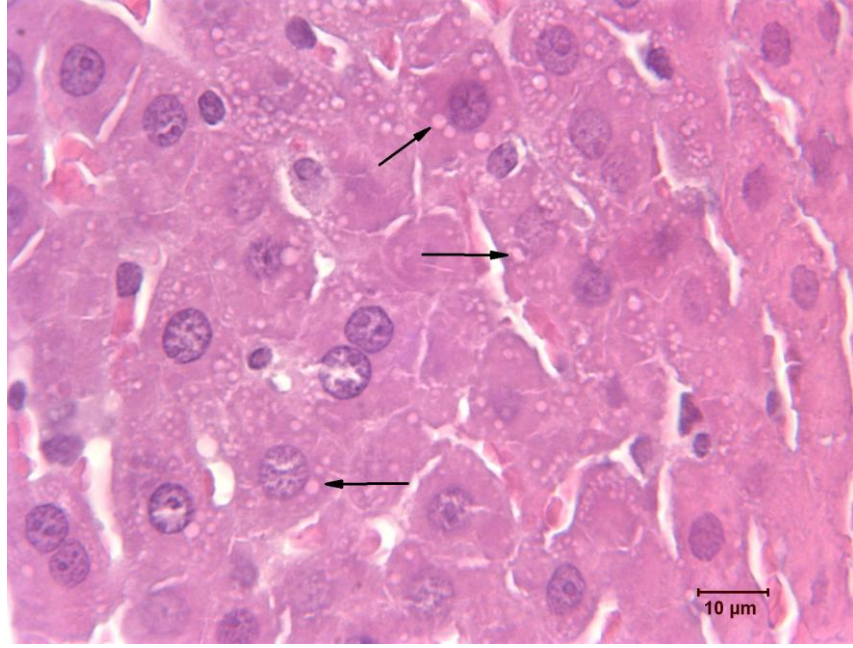
Şekil 4.10 İ/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde PMNL infiltrasyonu (H&E).



Şekil 4.11 İ/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde sinusoidal kanama (H&E).

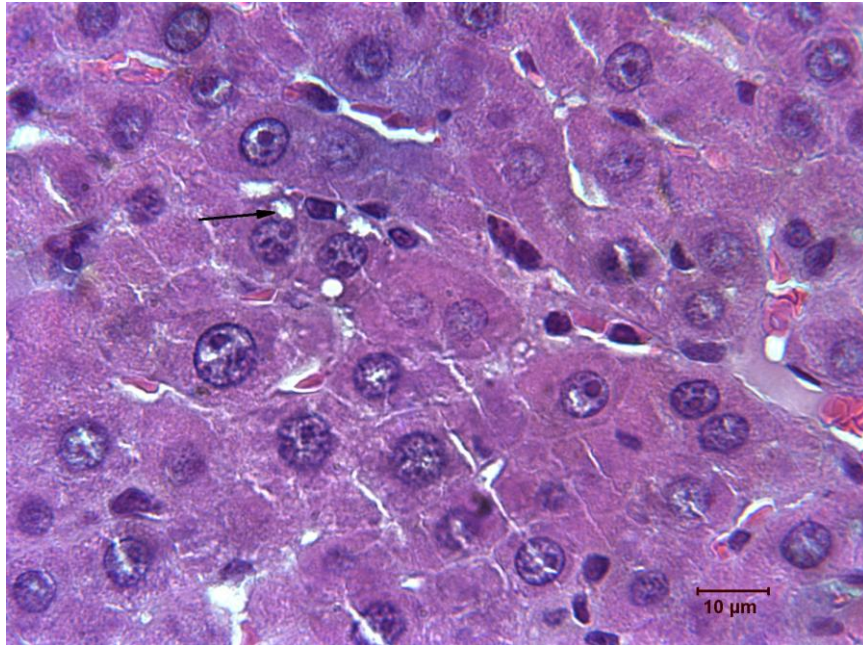


Şekil 4.12 İ/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde nekrotik alanlar (H&E).



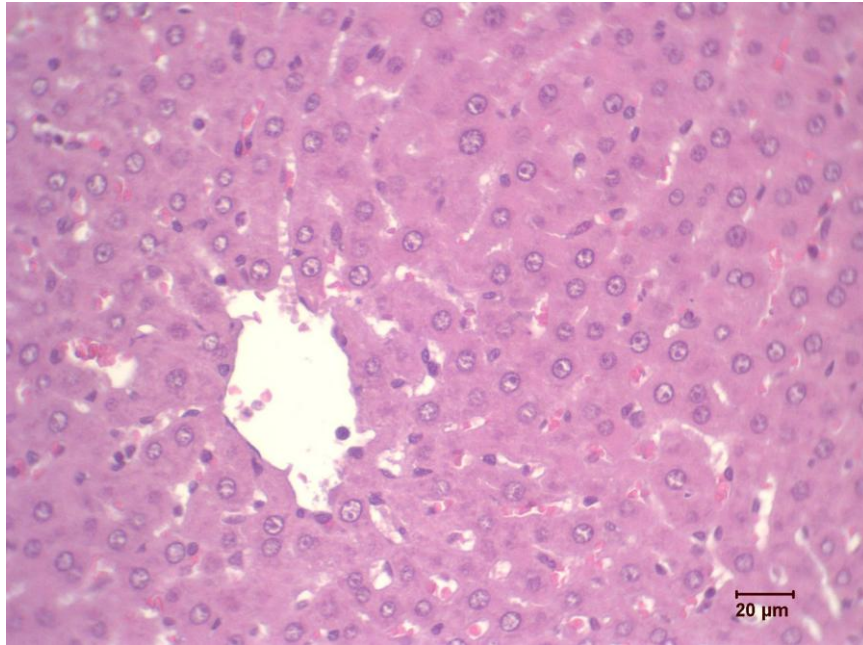
Şekil 4.13 İ/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde hepatositlerde yaygın vakuolizasyon (H&E).

Deneysel çalışmamızın temelini oluşturan gallik asit uygulamasının 50 mg.kg^{-1} olarak uygulandığı Grup III sıçanlarına ait karaciğer doku kesitlerinde nükleer infiltrasyon ve kanamanın azaldığı gözlemlendi. Bu gruba uygulanan renal İ/R' nin uzak organ hasarı göz önüne alındığında orta dereceli nekroz olgusu ve hepatositlerde vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 4.14). Deney hayvanlarına uygulanmış olan bu dozda gallik asitin karaciğer dokusunu İ/R hasarından korumadığı görüldü.



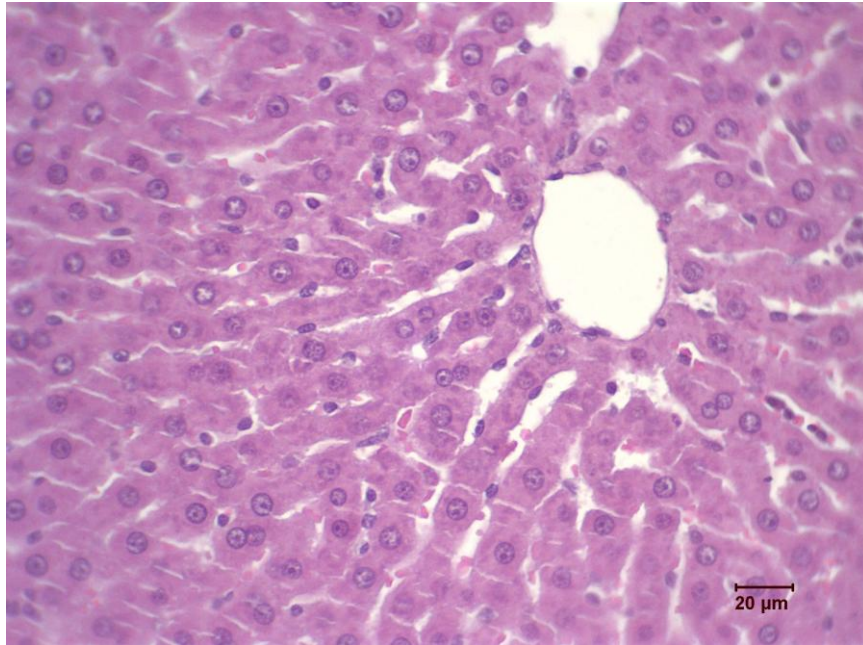
Şekil 4.14 İ/R + 50 mg.kg^{-1} Gallik asit grubu (Grup III) hayvanlarına ait karaciğer dokusuna ait hepatositlerde vakoluizasyon (H&E).

Çalışmamızda 100 mg.kg^{-1} gallik asit uygulanan Grup IV sıçanlarından elde edilen karaciğer doku kesitlerinde yapılan inceleme sonucunda sinusoidlerde kanama ve nükleer infiltrasyon gözlenmiş olup nekroz ve vakuolizasyonun kısmen yer aldığı tespit edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 İ/R + 100 mg.kg^{-1} Gallik asit grubu (Grup IV) hayvanlarına ait karaciğer kesiti (H&E).

Grup V sıçanlarında yapılan incelemede uygulanan dozun İ/R'nin uzak organ hasarında koruyucu etki gösterdiği ve bu bağlamda yapılan incelemeler sonucunda düşük seviyede nükleer infiltrasyon ve kanama gözlenmiş olup, dokuda nadir nekroz durumu gözlenmiştir. Vakuolizasyon olgusuna ise rastlanmamıştır. Bu incelemeler ışığında karaciğer doku preparatları kontrol grubu ile yakın yapısal özellikler göstermiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 İ/R + 200 mg.kg⁻¹ Gallik asit grubu (Grup V) hayvanlarına ait karaciğer kesitinde neredeyse tamamen korunmuş hepatositler (H&E).

4.2.2. Histolojik analizlerin istatistiksel değerlendirmesi

Yapılan histolojik analizlerin skorlaması izelge 4.3' te verilmiştir.

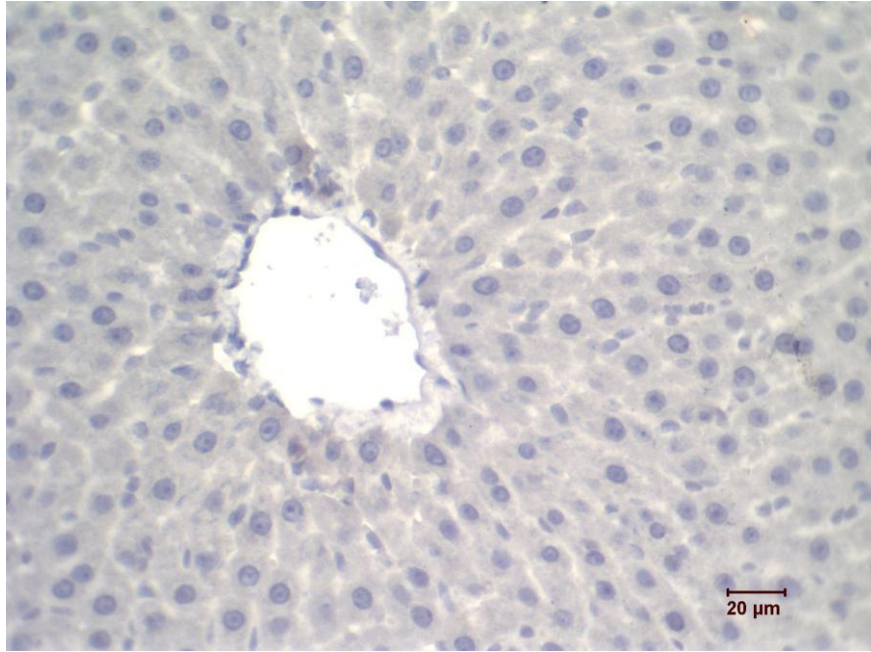
Çizelge 4.3 Gruplara ait histolojik değerlendirme

Grup	Nükleer infiltrasyon	Kanama	Hücre ölümü	Vakuol oluşumu
I	0	0	0	0
II	5	4	5	4
III	4	3	4	3
IV	3	2	2	2
V	1-2	1	0-1	0

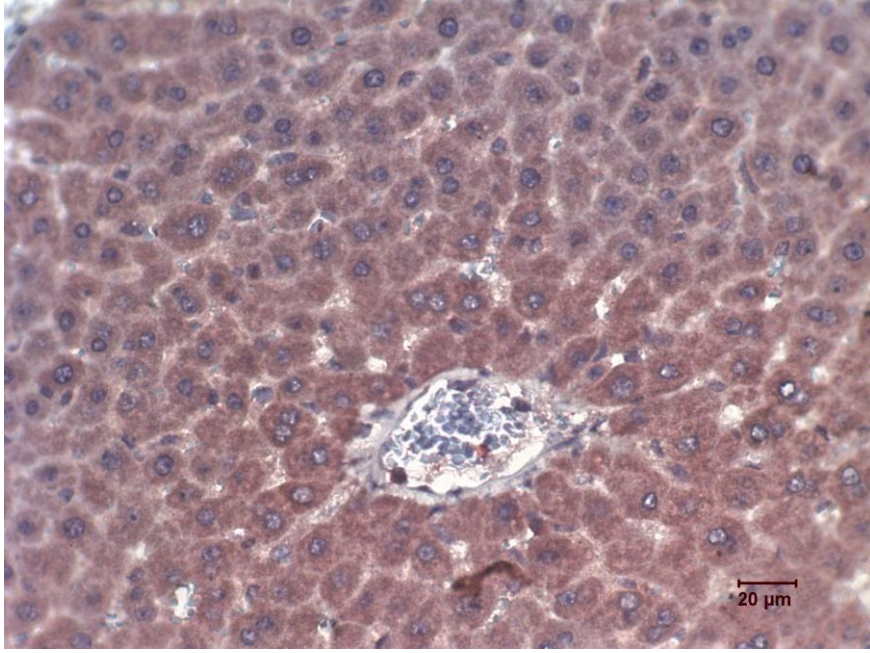
4.2.3. İmmunohistokimyasal analizler

İmmunohistokimyasal boyama uygulanmış karaciğer doku kesitlerinde tüm kesit alanları mikroskopik olarak incelenerek iNOS içeriği belirlendi. Deney hayvanlarının her birine ait kesitlerde iNOS pozitif olan hücrelerde kıvıl kahverengi boyalı görünüm dikkat çekici bulundu. Buna göre Grup I hayvanlarının karaciğer kesitlerindeki normal görünümlü hücrelerde iNOS reaksiyonu negatif olarak değerlendirildi (Şekil 4.17). Grup II' ye ait karaciğer kesitlerinde ise hücrelerin yoğun iNOS pozitif bir görünümde olduğu saptandı (Şekil 4.18). Grup III ve IV'ün iNOS değerlendirmelerinin sonucu

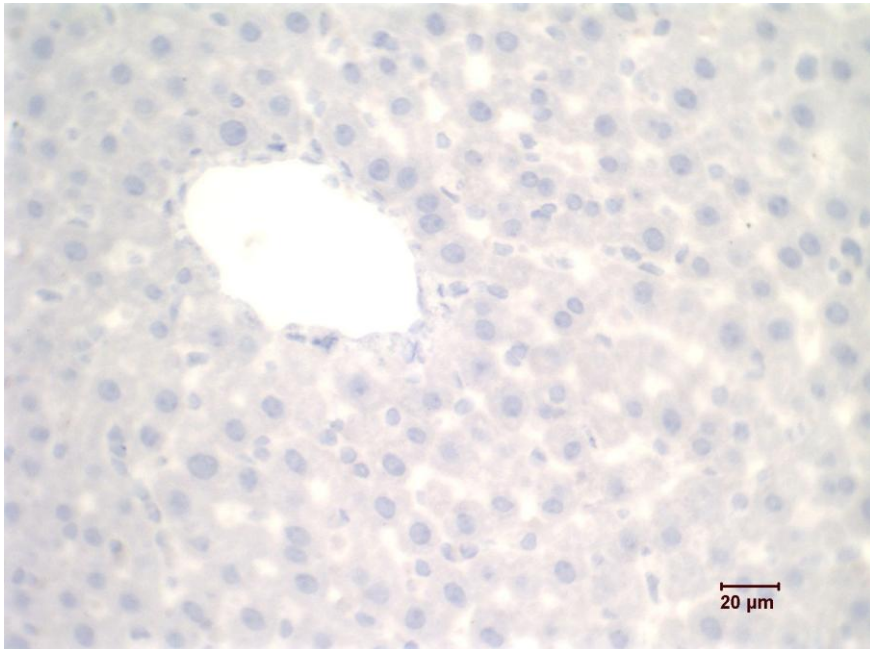
Grup V'de olduğu kadar iNOS negatif bulunamadı. H&E boyanmış karaciğer kesitlerinde yapılan incelemeler sonunda Grup V'in karaciğer dokularının İ/R hasarından korunmuş olması durumu da dikkate alınarak iNOS negatif oluşu önemli bulundu (Şekil 4.19).



Şekil 4.17 Kontrol grubu (Grup I) hayvanlarına ait karaciğer kesitlerindeki normal görünümlü iNOS negatif hücreler.



Şekil 4.18 İ/R grubu (Grup II) hayvanlarına ait karaciğer kesitlerindeki iNOS pozitif hücreler



Şekil 4.19 İ/R + 200 mg.kg⁻¹ Gallik asit grubu (Grup V) hayvanlarına ait karaciğer kesitlerindeki normale yakın görünümlü iNOS negatif hücreler

4.2.1. İmmunohistokimyasal analizlerin istatistiksel değerlendirmesi

Yapılan immunohistokimyasal analizlerin skorlaması Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 Gruplara ait immünohistokimyasal değerlendirme

Gruplar	I	II	III	IV	V
İnos reaksiyonu	0	4	3	2	1

5. TARTIŞMA

Bir organ ya da dokuya kan akımının kesilmesi ve sonrasındaki reperfüzyon süreci, hücre ölümü ve organın fonksiyon kaybına yol açan bir dizi patolojik reaksiyonu başlatır. Son yıllarda araştırma tekniklerinin gelişmesiyle birlikte bu patolojik durumun ortaya çıkmasında, reperfüzyon sürecindeki olayların hasara yol açtığı anlaşılmıştır. Reperfüzyon hasarı sonucu oluşan fonksiyon bozukluğu organdan organa farklılıklar göstermekle birlikte, bu hasardan oksijen radikallerinin sorumlu olduğu belirlenmiştir. Reperfüzyon, lipid peroksidasyonuna, karbonhidrat depolimerasyonuna ve DNA yapısının bozulup, yıkılmasına neden olur.

Bir organda İ/R gerçekleşmesi, uzaktaki bir organda da oksidatif hasara sebep olabilir (Gulec, et al., 2008). Renal İ/R hasarının, beraberinde karaciğerde de hasara neden olduğu bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Golab, et al., 2009; Sizlan, et al., 2009).

İ/R hasarının mekanizması karmaşık olup karaciğer hasarında SOR'ların, bu değişikliklerin ana nedeni olduğu düşünülmektedir (Basım, 2005; Özel, 2006). Kupffer hücrelerinden salınan SOR'lar bir dizi karmaşık inflamatuvar olaylar zincirini başlatarak nötrofilleri aktive eder. Aktive olmuş nötrofiller ise endotel hücrelerine yapışarak çeşitli proteazlar ve SOR salgılayıp hasarı daha da kötüleştirirler (Eltzschig and Collard, 2004; Frangogiannis, 2007). Hücre içinde en önemli SOR kaynağının mitokondri olduğu ve SOR'ların nötrofil aktivasyonunu uyararak hepatosit ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (Dawson, et al., 1993).

SOR oluşumunu ve bunların yol açtığı hasarı önlemek için hücrede birçok antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir

reaksiyonunu engelleyerek ve/veya SOR toplayarak lipid peroksidasyonunu önlemeye çalışırlar (Akkuş, 1995).

Deneylerimizin sonucu, kullandığımız gallik asitin, antioksidan aktivitesi sayesinde lipid peroksidasyonu hasarlarının azaltılmasında etkin rol oynadığını ve renal İ/R'ye bağlı uzak organ hasarına karşı karaciğeri koruduğunu gösterdi.

Çalışmamızdan elde edilen istatistiksel verilere göre; gruplar arasında serum ALT ve AST değerleri açısından anlamlı farklar gözlemlendi. İ/R uygulanan grupta ALT ve AST değerleri kontrol grubuna göre yüksek, tedavi gruplarında (50,100,200 mg.kg⁻¹ gallik asit) bu değerlerin ise doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi.

Fadillioglu ve arkadaşlarına (2008) göre renal İ/R'ye bağlı karaciğer uzak organ hasarında ALT ve AST değerlerinin anlamlı bir şekilde arttığı ve tedavi gruplarında ise, çalışmamıza paralel olarak bu değerlerin azaldığı gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar Sener ve arkadaşları (2003) tarafından yapılmış olan araştırmanın verileriyle de uyumlu bulunmuştur. Renal İ/R'nin neden olduğu böbrek hasarında da ALT ve AST değerlerinin kontrol gruplarına göre zamana bağlı olarak artış gösterdiği rapor edilmiştir (Kadkhodae, et al., 2009). Benzer araştırmalarda da karaciğer İ/R'si sonucu oluşan hasarda ALT ve AST değerleri, uzak organ hasarında olduğu gibi kontrol ve tedavi gruplarına göre artış göstermiştir (Sener, et al., 2003; Aydın, vd., 2004; Daglar, et al., 2009). Uyanoglu ve arkadaşları (2008) yaptığı çalışmada, parsiyal hepatektomi sonucu kontrol grubuna göre hasta kontrol grubunda ALT oranında artma ve hasta kontrol grubuna göre antioksidan uygulanmış deney gruplarında ise AST oranında düşüş gözlemlenmiştir. Bu da bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir.

İ/R sonucu uzak dokulara gelen bir PMNL olan nötrofiller tarafından salınan SOR, dokularda yıkıcı bir takım etkiler gerçekleştirir. Yapılan bazı çalışmalarda İ/R

hasarı sonucu SOR tarafından gerçekleşen lipid peroksidasyonu (Korthuis, et al., 1985; Rhoden, et al., 2002) ve SOR'un canlı hücrelerdeki bazı moleküllerle girdikleri reaksiyonlar sonucu doku hasarı oluşturduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır (Aydoğdu, vd., 2005; Korkmaz and Kolonkaya, 2009). Oluşan bu hasara karşı organizmanın antioksidan savunma sistemleri olarak bilinen SOD, CAT, Gpx gibi enzimleri kullanarak bu etkiyi ortadan kaldırmaya çalıştığı vurgulanmıştır (Ozan, vd., 2004).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre İ/R grubunun SOD1 ve SOD2 aktivitesi kontrol grubununkinden yüksek bulunmuştur. Tedavi gruplarında ise İ/R grubuna göre SOD aktivitelerinde genel anlamda bir düşüş olmuştur.

Bulgularımız yapılan bazı çalışmalarla da desteklenmektedir. Bazı araştırmacılara göre SOD aktivitesi İ/R grubunda, kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş; buna ek olarak SOD aktivitesinin tedavi gruplarında, İ/R grubuna göre düşüş gösterdiği bildirilmiştir (Karaayvaz, vd., 1996; Karabiga, vd., 2007; Sızlan, et al., 2009). Bu da çalışmamızda doz artışına bağlı olarak SOD1 ve Grup V'in SOD2 aktivitesinin düşüşünü açıklamaktadır.

Buna karşın Grup III ve IV hayvanlarının karaciğer dokusunda SOD2 aktivitesinin İ/R grubuna göre artış göstermesi de bazı çalışmalarla desteklenmektedir. Bu çalışmalara göre tedavi gruplarındaki SOD aktivitesinin, İ/R grubundaki SOD aktivitesinden yüksek olduğu rapor edilmiştir (Aydoğdu, vd., 2005; Fadillioğlu, et al., 2008). Ancak çalışmamızda Grup III ve IV'ün SOD2 aktivitesinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir.

Çalışmamızda CAT aktivitesi İ/R'ye bağlı olarak Grup II'de kontrol ve tedavi gruplarına göre yüksek bulundu. Bu durum İ/R grubundaki hayvanların böbrek dokusunda SOR üretimindeki artışın karaciğere olan etkisinin bir göstergesi

olabileceğini düşündürmektedir. Tedavi gruplarımızda ise İ/R grubuna göre anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda CAT aktivitesinin tedavi gruplarında İ/R grubuna göre düşüş gösterdiği bildirilmiştir (Serteser, et al., 2002; Jayakumar, et al., 2006, 2007). Buna paralel olarak, çalışmamızda CAT aktivitesi Grup III ve V'de düşüş göstermiştir. Öte yandan birtakım çalışmalarda ise tedavi gruplarında CAT aktivitesinin yükseldiği gözlenmiştir (Fadillioğlu, et al., 2008). Bizim çalışmamızda da Grup IV'de CAT aktivitesinin yükselmesi bu şekilde açıklanabilir.

Bulgularımızdaki tüm Gpx izoformlarının aktiviteleri değerlendirildiğinde İ/R grubunun Gpx aktivitesi kontrol ve tedavi gruplarından yüksek bulunmuş olup tedavi gruplarının Gpx aktivitesinde doz artışına bağlı olarak düşüş gözlenmiştir.

Sızlan ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada Gpx aktivitesinin İ/R grubunda kontrol grubuna göre artış ve tedavi grubunda da düşüş gösterdiğini rapor etmişlerdir. Buna ek olarak Hassan ve arkadaşları (2005) Gpx aktivitesinin kontrol grubuna göre karaciğer transplantasyonu sonrası zamana bağlı olarak artış gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Bazı araştırmacılar çalışmalarında dışarıdan alınan antioksidanların karaciğer dokusunda ve diğer dokularda CAT, SOD, Gpx enzim aktivitelerini arttırdığını rapor etmişlerdir (Aydoğdu, vd., 2005; Jayakumar, et al., 2006, 2007; Ramesh, et al., 2009).

Öte yandan İ/R sonucunda antioksidan uygulamasıyla birlikte, antioksidan enzim aktivitesinin arttığını gösteren çalışmalar da olmuştur (Kurt, vd., 2005; Jayakumar, et al., 2006). Biz ise, çalışmamızda İ/R sonrası belli dozlarda antioksidan

enzim aktivitesinde önemli düşüş gözlemledik. Yapılan çalışmalar arasındaki farklılıkların büyük olasılıkla deney hayvanı türü, metod, İ/R modeli (iskemi ve/veya reperfüzyon süresi) gibi farklılıklardan kaynaklanmış olabileceğini söyleyebiliriz.

Histolojik değerlendirmelerde İ/R uygulanan organda yoğun nekroz (Önal, vd., 2004; Aydoğdu, vd., 2005; Kiriş, vd., 2007), yaygın kanama alanları (Ozan, vd., 2004; Daglar, et al., 2007; Kiriş, vd., 2007), nükleer infiltrasyon (Ozan, vd., 2004; Kiriş, vd., 2007; Canbek, et al., 2008) ve vakuolizasyon (Canbek, et al., 2008; Senturk, et al., 2008) gibi histopatolojik değişimler gösterdiği bildirilmiştir.

Çalışmalarımız histolojik olarak baktığımızda Grup I hayvanlarına ait doku örneklerinin karaciğer kesitinde, sentral ven çevresindeki hepatositler normal yapı göstermiştir.

Çalışmamızda da Grup II hayvanlarında renal İ/R'nin uzak organ hasarı sonucu karaciğerde yoğun nükleer infiltrasyon, yaygın kanama alanları, yoğun nekroz ve hücrel vakuolizasyon gözlenmiştir (Sener, et al., 2003; Sizlan, et al., 2009; Wang, et al., 2009). Kadkhodae ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları çalışmada renal İ/R sürecinin karaciğer üzerine etkisi araştırılmış ve iskemi süresinin artışına bağlı olarak uzak dokuda hasarın arttığı rapor edilmiştir. Benzer sonuçlar Wang ve arkadaşları (2009) tarafından da desteklenmiştir.

Yapılan çalışmalarda İ/R sonucu oluşan veya başka türlü gelişen oksidatif strese karşı antioksidan maddelerin doku bütünlüğünü koruduğu bildirilmiştir (Sener, et al., 2003; Kurt, vd., 2005; Jayakumar, et al., 2006; Canbek, et al., 2008; Senturk, et al., 2008).

Grup III ve Grup IV'deki histolojik değerlendirmelere göre nüklear infiltrasyon, kanama alanlarında, nekroz ve vakuol oluşumunda doz artışına bağlı olarak azalma gözlenmiştir. Bu bulgularımız başka çalışmalarla da desteklenmiştir (Senturk, et al., 2008; Gündüz, 2010).

Grup V hayvanlarının karaciğer dokusu incelendiğinde, yapılan çalışmalarla da paralel olarak, nüklear infiltrasyon ve kanamada anlamlı düşüş gözlenmiş olup nekroz ve hücresel vakuolizasyon durumuna rastlanmamıştır (Sener, et al., 2003; Senturk, et al., 2008; Sızlan, et al., 2009). Bu grupta hücre bütünlüğü korunmuş olup histopatolojik olarak kontrole yakın değerler gözlenmiştir.

Uyanoglu ve arkadaşları (2008) yaptığı parsiyal hepatektomi çalışmasında da histolojik olarak, kullandığı farklı antioksidanların karaciğer rejenerasyonunu olumlu yönde etkilediğini rapor etmiştir.

NO, fizyolojik ve patolojik olaylarda hücresel toksisiteyi gösteren bir biyomolekldr. NO, L-argininden sitrulin oluşumu sırasında, L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidrosilasyonu ile oluşan ara üründür. Bu reaksiyon, bir dizi NOS enzimi tarafından katalize edilir. Nitrik oksit sentaz enzimleri, cNOS ve iNOS olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Normal fizyolojik süreç için cNOS ile üretilen miktarlara gereksinim vardır. Doku hasarı ve zedelenmesi gibi durunlarda ise iNOS ile aşırı miktarda NO retilir. Akut inflmatuar olaylarda iNOS ile üretilen miktarlar, hem koruyucu hem de zarar verici olabilir. (Kuyumcu, vd., 2004). Raj ve Baylis (1995), aşırı NO üretiminin çeşitli durumlarda patojenik olabileceğini bildirmişlerdir. NO, glomerular kapiller kan basıncının, glomerular plazma akışının ve glomerular filtrasyon hızının fizyolojik düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. NO, glomerular basıncın ve akımın hareketinde, makro ve mikromolekler düzeyde düzenleyici olabilir. Glomerular inflamasyon süresince, glomerular hücreler veya makrofajlardan sentezlenen büyük miktardaki NO hasara yol açabilir (Aras, 2008).

Çalışmamızda renal İ/R yapılmış sıçanların karaciğer dokusunda immunohistokimyasal olarak iNOS reaksiyonu değerlendirildi. Grup II'de iNOS pozitif alanları yoğun olarak görüldü. Buna karşın tedavi gruplarında iNOS reaksiyonlarında boyanmanın doz artışına bağlı olarak düşüş gösterdiğini tespit ettik. Grup III'te Grup II'ye yakın; Grup V'te ise Grup I'e yakın iNOS reaksiyonu gözlenmiştir. Çalışmamızda belirlenen Grup V'te (200 mg.kg^{-1} gallik asit) iNOS aktivasyonunun kontrole yakın olması, iNOS sentezinin durdurulmasının patofizyolojik olayları kısmen engellediğini işaret etmektedir. Bu durum İ/R'nin iNOS üretimindeki önemini bize göstermektedir. Gündüz (2010) de çalışmasında benzer duruma dikkat çekmektedir. Dokuda immünohistokimyasal boyama ile belirlediğimiz NO seviyesinin biyokimyasal parametrelerimizle doğru orantılı olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda, biyokimyasal ve histolojik analiz verileri istatistiksel olarak göz önüne alındığında, bir fenolik asit olan gallik asitin 200 mg.kg^{-1} dozunun renal İ/R hasarından öncesi, intraperitoneal olarak uygulandığında, uzak organ olan karaciğer üzerine koruyucu etkili olduğu ortaya konmuştur.

Sonuç olarak; organizmada oluşan serbest radikallerin etkisini azaltmak için doğal fenollerin (renkli sebze ve meyveler) tüketilmesinin, antioksidan enzimlerin tetiklenmesi açısından son derece önemli olduğunu söyleyebiliriz.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Acworth, I.N., McCabe, D.R., Mather, T.J., 1997, The analysis of free radicals, their reaction products and antioxidants, Oxidants, Antioxidants and Free Radicals, Taylor & Francis Washington, DC., 10, 23-77.

Akay ,T., Genel histoloji, 2006, Palme yayıncılık, 61-63.

Akino, K., Akita, S., Mizuguchi, T., Takumi, I., Yu, R., Wang, X., Rozga, J., Demetriou, A.A., Melmed, S., Ohtsuru, A., Yamashita, S., 2005, A novel molecular marker of pituitary tumor transforming gene involves in a rat liver regeneration, The Journal of Surgical Research, 129, 142-146.

Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., Iwatsuki, K., 2001, Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus.*, J Antimicrob Chemother. Oct;48(4):487-91.

Akkoç, H., 2008, Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı, Dicle Tıp Dergisi, 3, 211-215.

Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, s.1-60.

Aktay, G., Deliorman, D., Ergun, E., Ergun, F., Yeşilada, E., Çevik C., 2000, Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury, Journal of Ethnopharmacology 73, 121-129, p.

Alper, M., 1993, İnvital mikroskopide modifiye bir model: izole kremaster kas ada flebinde değişik perfüzyon solüsyonlarının iskemi/reperfüzyon hasarına etkisi, Uzmanlık Tezi. T.C Ege üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, 61 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Aras, B., 2008, Klinik Streptozosin ile Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Prolidyum Dithiyokarbamat'ın Böbrek Dokusu Üzerine Koruyucu Etkisi, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Bakırköy Dr. Sadi konuk eğitim Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
- Assy, N., Gong, Y., Zhang, M., Pettigrew, N.M., Pashniak, D. and Minuk, G.Y., 1998, Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *J Lab Clin Med.*, 131, 251-256, p.
- Aşıcıoğlu, Y.T., 2005, Sıçanlardaki kronik alkolik karaciğer hasarına likopenin etkisi, uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, 64.
- Aoki, T., Murakami, M., Niiya, T., Murai, N., Shimizu, Y., Kato, H. and Kusano, M., 2001, Capacity of hepatic regeneration following a second partial hepatectomy in rats, *Hepatology Research* 21, 228-241, p.
- Aydın C., Kennerman E., Galip N., Yalçın M., Ak F., Kayaalp C., 2004, Hepatik iskemi-reperfüzyon hasarının sıçanlarda alyuvar ve plazma elektrolit dengesi, bazı serum biyokimyasal parametreleri ve karaciğer hücre histolojisi üzerine etkisi, *Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.* 23, 1-2-3: 77-82.
- Aydoğdu, N., Kaymak, K., Yalcin, Ö., 2005, Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında n-asetilsisteinin etkileri, *Fırat Tıp Dergisi*, 10 (4): 151-155.
- Baker, G.L., Corry, R.J., Autor, A.P., 1985, Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion protective effect of superoxide dismutase. *Ann Surg.*;202(5):628-41.
- Baron, P., Gomez-Marin, O., Casas, C., Heil, J., Will, N., Condie, R., Burke, B., Najarian, J.S., Sutherland, D.E., 1991, Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury. *J Surg Res.* ;51(1):60-5.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Basım, S., 2005, Alt ekstremitelerde iskemi-reperfüzyon oluşturulan ratlarda *Ginkgo biloba* EGB 761'in barsak anastomoz iyileşmesi üzerine etkisi, Uzmanlık Tezi, T.C.Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği, 50.
- Baykal, Y., Pay, S., Özet, G., Ünal, T., Özdemir, Ç., Özet, A., Kocabalkan, F., 1996, Endotelin, Türkiye Klinikleri J Med Sci 16: 8-12.
- Baykara, B., Tekmen, I., 2005, Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı, DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi , cilt: 19 sayı:3 185-194.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem. 44:276-87.
- Bilzer, M., Gerbes, A.L., 2000, Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. J Hepatol.;32:508-15.
- Burak, M., Çimen, Y., 1999, Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. T Klin Tıp Bilimleri , 296-304.
- Burtis, C. A., Ashwood E. R., 2005, Klinik kimyada temel ilkeler, (Çev. D. Aslan), Palme yayıncılık, s 352-356, s 747-756.
- Canbek, M., Uyanoglu, M., Bayramoglu, G., Senturk, H., Erkasap, N., 2008, Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. Phytomedicine. 15:447-52.
- Cebeci, O. Ö., 2007, Ratlarda böbrek iskemi-reperfüzyon hasarının erken döneminde sildenafil sitratin etkinliği, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, 51 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J. D., Rakariyatham, N., 2007, Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk, Food Chemistry 100, 1044–1048.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Morand, C., Lattanzio, F., Dell'aquila, G., Zuliani, G., Di Iorio, A., Andres-Lacueva, C., 2008, Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. *Curr Med Chem.*; 15: 1236-1248.
- Conesa, E.L., Valero, F., Nadal, J.C., Fenoy, F.J., López, B., Arregui, B., Salom, M.G., 2001, N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 281(3):R730-7.
- Cooper, M. G., Hausman, R. E., 2006, Hücre moleküler yaklaşım, (Çev. M. Sakızlı, N. Atabey), İzmir tıp kitabevi, s 528-531.
- Curtin, J.F., Donovan, M., Cotter, T.G., 2002, Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis, *J. Immunol Methods*, 265, 49-72.
- Çakan, M., Çakan, T., Aydos, T., Yılmaz, D., Ögüş, E., Kılıç, A. S., 2007, Sıçan testisindeki iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan oksidatif stres ve histopatolojik değişiklikler üzerine ketoprofenin koruyucu etkisi, *Türkay Türk Üroloji Dergisi*, 33, 50-55.
- Daglar, G., Karaca, T., Yuksek, Y. N., Gozalan, U., Akbiyik, F., Sokmensuer, C., Gurel, B., Kama, N. A., 2009, Effect of montelukast and MK-886 on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats, *Journal of Surgical Research* 153, 31-38.
- Dawson, T. L., Gores, G. J., Nieminen, A. L., Herman, B., Lesmasters, J. J., 1993, Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, 264: C961-C967.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Dilek, O. N., 2003, Karaciğer (cilt 1), Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları, Yayın no: 58, s 1-75.
- Ekbul, A., 2004, Diyetsetel polifenoller ve kardiyovasküler sistem. T Klin Kardiyoloji , 48-54.
- Eltzschig, H.K., Collard, C.D., 2004, Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull ; 70: 71-86.
- Ergün, Y., 2006, Çizgili kas iskemi-reperfüzyon hasarı ve nitrik oksit ile ilişkisi, 15,133.
- Eyles, A., Davies, N.W., Mitsunaga, T., Mihara, R., Mohammed, C., 2004, Role of Eucalyptus globulus wound wood extractives: evidence of superoxide dismutase-like activity, Forest Pathol. 34, 225–232.
- Fadillioglu, E., Kurcer, Z., Parlakpınar, H., Iraz, M, Gursul, C., 2008, Melatonin treatment against remote organ injury induced by renal ischemia reperfusion injury in diabetes mellitus. Arch Pharm Res. 31:705-12.
- Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. J., Girão da Cruz, M. T., Cordeiro, M. N. D. S., Milhazes, N., Borgesa, F., Marquesa, M. P. M., 2004, Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of ca.eic and gallic acids. Bioorganic & Medicinal Chemistry 12, 3581–3589.
- Frangogiannis, N.G., 2007, Chemokines in ischemia and reperfusion. Thromb Haemost; 97: 738-747.
- Furuta, K., Kakita, A., Takahashi, T., Tomiya, T. and Fujiwara, K., 2000, Experimental study on liver regeneration after simltenous partial hepatectomy and pancreatectomy, Hepatology Research, 17, 223-236, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- 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.
- García-Villalón, A.L., Amezcua, Y.M., Monge, L., Fernández, N., Salcedo, A., Diéguez, G., 2008, Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol*; 48:109-114.
- Golab, F., Kadkhodae, M., Zahmatkesh, M., Ghaznavi, R., Arab, H.A., Seifi, B., Soleimani, M., 2009, Hepatic changes during various periods of reperfusion after induction of renal ischemia in rats. *Transplantation Proceedings*, 41, 2749-2750.
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006, Algal antioksidanlar. *EÜ Su ürünleri Dergisi*,23, 85-89.
- Gramza, A., Korczak, J., 2005, Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology* 16, 351–358.
- Gulec, B., Coskun, K., Yigitler, C., Yigit, T., Aydin, A., Oner, K., 2008, Ischemia-reperfusion injury in the liver during renal transplantation: does perfusion solution play any role? *Transplantation Proceedings*. 40:59–62.
- Gündüz, Ö., 2010, Sıçanlarda renal iskemi/reperfüzyon sırasında oluşan oksidatif stres hasarına karşı karvakrolün olası koruyucu etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, s 46.
- Hassan, L., Bueno, P., Ferron-Celma, I., Ramia, J.M., Garrote, D., Muffak, K., García-Navarro, G., Mansilla, A., Villar, J.M., Ferron, J.A., 2005, Time course of antioxidant enzyme activities in liver transplant recipient, *Transplantation Proceedings*, 37, 3932-3935.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Homer-Vanniasinkam, S., Crinnion, J.N., Gough, M.J., 1997, Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* ;14: 195-203.
- Janga, A., Srinivasan, P., Lee, N., Song, H., Lee, J., Lee, M., Jo, C., 2008, Comparison of hypolipidemic activity of synthetic gallic acid–linoleic acid ester with mixture of gallic acid and linoleic acid, gallic acid, and linoleic acid on high-fat diet induced obesity in C57BL/6 Cr Slc mice, *Chemico-Biological Interactions* 174 109–117.
- Jayakumar, T., Ramesh, E., Geraldine, P., 2006, Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl(4)-induced liver injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 44:1989-96.
- Jayakumar, T., Thomas, P.A., Geraldine, P., 2007, Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol.* 42:183-91.
- Kadkhodae, M., Golab, F., Zahmatkesh, M., Ghaznavi, R., Hedayati, M., Arab, H.A., Ostad, S.N., Soleimani, M., 2009, Effects of different periods of renal ischemia on liver as a remote organ. *World J Gastroenterol*;15:1113-8.
- Kahraman, A., Erkasap, N., Serteser, M., Koken, T., 2003, Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats, *J Nephrol*, 16, 219-224.
- Kandilci, H. B., Gümüşel, B., 2005, Akciğerlerde iskemi-reperfüzyon hasarı ve iskemik önkoşullama, *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 25, 35-49.
- Karaayvaz, M., Öztürk, H. S., Elgün, S., Kaçmaz, M., Canbolat, O., Akgül, H., 1996, İnce Barsak İskemisi ve Serbest Radikal Metabolizması. *T Klin Tıp Bilimleri* 16:437-439.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Karabélyos, C., Dobozy, O., Szalai, C., Klenjánszki, K., Varjú, K., Hadházy, Á., Kiss, Á., Fulop, K. A., Madarász, B., Falus, A., 1999, elevated hepatic glucocorticoid receptor expression during liver regeneration in rats, *Cell and Immunobiology Nagyvárad*, 5, 107-9.
- Karabiga, M., Kiriş, İ., Yılmaz, N., Altuntaş, İ., Karahan, N., Okutan, H., 2007, Aprotinin deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde böbrek hasarına etkisi, 16, 9-18.
- Karaca, Ş., Güder, H., 2009, Dermatolojide antioksidan sistem, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Dermatoloji Anabilim Dalı Dergisi, 3, 32-39.
- Karihtala, P., Soini, Y., 2007, Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS*;115:81-103.
- Kaya, Y., Aral, E., Coşkun, T., Erkasap, N., and Var, A., 2002, Increased intraabdominal pressure impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *Journal of Surgical Research*, 108, 250-257, p.
- 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, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y., 2002, Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolic phytochemicals, *J. Agric. Food Chem.* 50, 3713–3717.
- Korkmaz, A., Kolankaya, D., 2009, Protective effect of rutin on the ischemia/reperfusion induced damage in rat kidney, *J Surg Res*, doi:10.1016/j.jss.2009.03.022, 2009.
- Korthuis, R.J., Granger, D.N., Townsley, M.I., Taylo, A.E., 1985, The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability, *Circ Res*, 57, 599-609.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kroes, B.H., Van den Berg, A.J., Quarles van Ufford, H.C., Van Dijk, H., Labadie, R.P., 1992, Anti-inflammatory activity of gallic acid, *Planta Med.* 58, 499–504.
- Kuliscic, T., Radonic, A., Katalinic, V., Milos, M., 2004, Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Chemistry.* 85:633-40.
- Kurt, H., Başaran, A., Aral, İ., 2005, Sıçanlarda karbon tetrakloritin oluşturduğu oksidatif stresin likopen ile önlenmesi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, (25) 167-173.
- Kuyumcu, A., Duzgun, P.A., Ozmen, M.M., Besler, H.T., 2004, Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü, *Ulus Travma Derg*, 10, 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.
- Laemmli, UK., 1970, Cleavage of structural proteins during the assemblage of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680–5.
- Lin, H.C., Chen, H.J., Hou, W.C., 2002, Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 23:513-16.
- Lopez-Neblina, F., Paez-Rollys, A.J., Toledo-Pereyra, L.H., 1996, Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. *J SurgRes*; 61: 469-472.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lu, Z., Nie, G., Belton, P.S., Tang, H., Zhao, B., 2006, Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochem Int.* Mar;48(4):263-74.
- Marwah, R. G., Majekodunmi, O. F., Mahrooqi, R. A., Varma, G. B., Abadi H. A., Al-Burtamani S. K. S., 2007 Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman., *Food Chemistry* 101 465–470.
- Memişoğulları, R., 2005, Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Mickle, D.A., Weisel, R.D., 1993, Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. *Can J Cardiol*; 9: 89-93.
- Monsinjon, T., Richard, V., Fontaine, M., 2001, Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol* ; 15: 293-306.
- Montalvo-Jave, E.E., Escalante-Tattersfield, T., Ortega-Salgado, J.A., Piña, E., Geller, D.A., 2008, Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res.* 147:153-9.
- Morton, L.W., Croft, K.D., Puddey, I.B., Byrne, L., 2000, Phenolic acids protect low density lipoproteins from peroxynitrite-mediated modification in vitro. *Redox Rep.*5(2-3):124-5. (a).
- 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. (b).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Muruganathan, M., Raju, G.B., Prabhakar, S., 2005, Removal of tannins and polyhydroxy phenols by electro-chemical techniques, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 1188–1197.
- Noiri, E., Nacao, A., Uchida, K., Tsukahara, H., Ohno, M., Fujita, T., Brodsky, S., Gligorsky, S. M., 2001, Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia, *Am. J. Physiol Renal Physiol*, 281, 948-57.
- Ozan, E., Koyutürk, L., Sapmaz, T., 2004, Böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidan olarak prostoglandin E1 (PGE1) kullanımının incelenmesi: deneysel çalışma, *Fırat Tıp Dergisi*, 9, 67-71.
- Önal, A., Astarcioglu, H., Örmən, M., Atila, K., Sarioğlu, S., 2004, Sıçandaki renal iskemi-reperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi. *Ulus Tarvma Derg*; 10(3): 160-167.
- Özel, Y., 2006, Ratlarda karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında grape seed proanthocyanidininin koruyucu etkilerinin incelenmesi, *Uzmanlık Tezi*, T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 5. Genel Cerrahi Kliniği, 23s.
- Parks, D.A., Williams, T.K., Beckman, J.S., 1988, Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* May;254 (5 Pt 1):G768-74.
- Pellegrina, C.D., Padovani, G., Mainente, F., Zoccatelli, G., Bissoli, G., Mosconi, S., Veneri, G., Peruffo, A., Andrighetto, G., Rizzi, C., Chignola, R., 2005, Antitumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*, *Cancer Letters* 226, 17–25.
- Peterson, J., Dwyer, J., 1998, Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* 18 (12), 1995-2018.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Priscilla, H.D., Prince, S.M., 2009, Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats, *Chemico-Biological Interactions*. 179:118-124. Doi: 10.1016/j.cbi.2008.12.012.
- Raij, L. and Baylis, C., 1995, Glomerular Actions of Nitric Oxide. *Kidney Int.*, 48;(1):20-32.
- Ramesh, E., Jayakumar, T., Elanchezhian, R., Sakthivel, M., Geraldine, P., Thomas, P.A., 2009, Green tea catechins, alleviate hepatic lipidemic-oxidative injury in Wistar rats fed an atherogenic diet. *Chemico-Biological Interactions* 180:10-19.
- Reiter, R.J., 1995, Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*; 9: 526-533.
- Rhoden, E.L., Rhoden, C.R., Lucas, M.L., Pereira-Lima, L., Zettler, C., Belló-Klein, A., 2002, The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia-reperfusion injury in rats, *Transpl Immunol*, 10, 277-84.
- Saba, D., Yavuz, H., Şenkaya, I., Ağrıç, M., Dirican M., Serdar, Z., Öztürk, H., Özer, Z., Özkan, H., 2000, Kalsiyum dobesilatın iskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarındaki rolü, *Turkish J Thorac and Cardiovasc Surg*, 8, 797-801.
- Sakaguchi, N., Inoue, M., Ogihara, Y., 1998, Reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺, common signals for apoptosis induced by gallic acid, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 55, pp. 1973-1981.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *J. Sci. Food. Agric.* 76,270-276.
- Sanz, N., Fernandez, C.D., Simon, L.F., Alvarez, A., Cascales, M., 1998, Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1384, 66-78, p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Saygılı, Ö., Gültekin, F., 1999, Hücre adezyon molekülleri, T Klin Tıp Bilimleri 19:362-365.
- Sener, G., Tosun, A., Şehirli, Ö., Kaçmaz, A., Arbak, S., Ersoy, Y., Ayanoğlu-Dülger, G., 2003, melatonin and n-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion, Life Sciences 72, 2707-2718.
- Sener, G., Sener, E., Şehirli, O., Ogunc, A.V., Cetinel, S., Gedik, N., Sakarcan, A., 2005, *Ginkgo biloba* extract ameliorates ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats, Pharmacological Research,; 52; 216-22.
- Senturk, H., Kabay, S., Bayramoglu, G., Ozden, H., Yaylak, F., Yucel, M., Olgun, E.G., Kutlu, A., 2008, Silymarin attenuates the renal ischemia/reperfusion injury-induced morphological changes in the rat kidney, World J Urol, 26, 401-7.
- Serracino-Inglott, F., Habib, N.A., Mathie, R.T., 2001, Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Surg.181:160-6.
- Serteser, M., Koken, T., Kahraman, A., Yilmaz, K., Akbulut, G., Dilek, O.N., 2002, Changes in hepatic TNF- α levels, antioxidant status, and oxidation product after renal ischemia/ reperfusion injury in mice. J. Sur. Res. 107 : 234-240.
- Shahzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, J., Bitsch, I., 2001, Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans, J. Nutr. 131 1207–1210.
- Sherlock, S., 1975, Karaciğer safra yolları hastalıkları, (Çev Ş. Karacadağ, R. Güçalp, M. Bayık), Ankara Hacettepe Üniversitesi, s 1-4, s 43.
- Sizlan, A., Guven, A., Uysal, B., Yanarates, O., Atim, A., Oztas, E., Cosar, A., Korkmaz, A., 2009, Proanthocyanidin protects intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusion injury. World J Surg. 33: 1384-1391.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Suzuki, M., Asako, H., Kubes, P., Jennings, S., Grisham, M.B., Granger, D.N., 1991, Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res*; 42: 125-138.
- Şehirli, A.O., 2001, Renal iskemi/reperfüzyon hasarında melatonin'in koruyucu etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Şener, G., Yeğen B.Ç., 2009, İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim*; 22 (3): 5-13.
- Şensoy, E., Öznurlu, Y., 2009, Hücre adezyon molekülleri, Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 4 (1): 57-68.
- Teke, Z., Kabay, B., Özden, A., 2008, İskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisi. *Pam. Tıp Derg*;1:65-72
- Temizkan, G., Arda, N., 2004, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi.
- Terekeci, M.H., Şahan, B, Top, C., 2008, Hücre adezyon molekülleri, *Nobel Med*; 4(1): 4-10.
- Theocharis, S.E., Margeli, A.P., Skaltsas, S.D., Spiliopoulou, C.A., Koutselinis S., 2001, Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats: an immunohistochemical study, *Toxicology* 161, 129-138, p.
- Tunalier, Z., Öztürk, N., Koşar, M., Başer, K. H., Duman, H., & Kırimer, N. 2002, (29-31 Mayıs). Bazı Sideritis türlerinin antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, (s. 130-138).

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Uyanoglu, M., Canbek, M., Aral, E., Başer, K. H. C., 2008, The Effects Of Carvacrol Upon The Liver of Rats Undergoing Partial Hepatectomy, *Phytomedicine*, 15, 226-9.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*; 39: 44-84.
- Van der Plaats, A., 2005, The groningen hypothermic liver perfusion system for improved preservation in organ transplantation, PhD-thesis University of Groningen.
- Virág, L., Szabó, C., 2002, The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*; 54: 375-429.
- Wang, B.-Y., Li, Q.-X., Li, J., Xie, X.-F., Ao, Y., Ai, Y.-X., 2009, Hepatotoxicity and gene expression down-regulation of CYP isozymes caused by renal ischemia/reperfusion in the rat, *Experimental and Toxicologic Pathology* 61 169-176.
- Waynforth, H.B., Flecknell, P.A., 1994, *Experimental and surgical technique in the rat*, second edition, Chapter, 29,174-175.
- Weight, S.C., Bell, P.R., Nicholson, M.L., 1996, Renal ischaemia--reperfusion injury. *Br J Surg*; 83(2):162-70.
- Welbourn, C.R., Goldman, G., Paterson, I.S., Valeri, C.R., Shepro, D., Hechtman, H.B., 1991, Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg*; 78: 651-5.
- Wilhelm, J., 1990, Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr*; 137:1-53.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahman, M.A., 1971, An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem.* 44:301-5.
- Woodfin, A., Voisin, M.B., Nourshargh, S., 2007, PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 27: 2514-2523.
- Woolfson, R.G., Millar, C.G., Neild, G.H., 1994, Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction. *Nephrol Dial Transplant.*;9(11):1529-31.
- Yang, Z., Zhang, D., Long, H., Liu, Y., 2008, Electrochemical behavior of gallic acid interaction with DNA and detection of damage to DNA, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 624, 91–96.
- 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 p.
- Zhang, W., Smith, C., Shapiro, A., Monette, R., Hutchison, J., Stanimirovic, D., 1999, Increased expression of bioactive chemokines in human cerebrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. *J Neuroimmunol* ; 101:148-160.
- Zhang, Y., Dong, L., Li, J., Chen, X., 2008, Studies on the interaction of gallic acid with human serum albumin in membrane mimetic environments. *Talanta* 76, 246–253.

Zimmerman, B.J., Granger DN., 1992, Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*; 72: 65-83.