

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KARACİĞER İSKEMİ ve REPERFÜZYONDA QUERCETİN'İN
KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Mustafa Ufuk UYLAŞ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2015

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KARACİĞER İSKEMİ ve REPERFÜZYONDA QUERCETİN'İN
KORUYUCU ETKİSİ

Dr. Mustafa Ufuk UYLAŞ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
Prof. Dr. Adnan ŞAHİN

ESKİŞEHİR
2015

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T. C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Mustafa ufuk UYLAŞ'a ait ” Karaciğer iskemi ve reperfüzyonda Quercetinin koruyucu etkisi ” Adlı çalışma jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı

Prof .Dr.Adnan ŞAHİN
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye

Prof .Dr. Ercüment PAŞAOĞLU
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye

Prof.Dr.Yavuz KAYA
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun..... Tarih ve..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Enver İHTİYAR

Dekan Vekili

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan sayın hocam Prof. Dr. Adnan ŞAHİN' e ve Genel Cerrahideki eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren değerli hocalarıma, ayrıca tezimin hazırlanmasında katkıları olan Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Özkan ALATAŞ'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK'e ve istatistiklerin hazırlanmasında bana yardımcı olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Didem ARSLANTAŞ' a yardımları için teşekkür ederim.

ÖZET

Uylaş, M. U. Karaciğer iskemi reperfüzyonda Quercetin'in koruyucu etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi , Eskişehir, 2010. Karaciğer iskemi-reperfüzyon uygulanmış ratlarda Quercetin'in karaciğer hasarında antioksidan özelliği ile düzeltici etkisinin incelenmesi amacıyla cinsiyetleri erkek olan ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen Sprague-Dawley cinsi 50 adet rat kullanıldı. 10' ar adet rattan oluşan sham grubu, karaciğer İ/R grubu, karaciğer İ/R + 25mg/kg Quercetin grubu, karaciğer İ/R + 50mg/kg Quercetin grubu ve karaciğer İ/R + 100mg/kg Quercetin grubu olmak üzere beş gruba ayrıldı. Sham grubuna sadece laparotomi yapıldı. Diğer gruplardaki tüm ratlara laparotomi sonrası karaciğere 1 saat iskemi 2 saat reperfüzyon uygulandı. Reperfüzyon sonrası ratlardan Aspartat transaminaz (AST), Alanin transaminaz (ALT), Katalaz (CAT), Malondialdehid (MDA) için kan örnekleri, ayrıca Malondialdehid (MDA) için karaciğer doku örnekleri, histopatolojik inceleme için karaciğer doku örnekleri alındı. Tedavi gruplarında AST, ALT, MDA (serum) değerlerinde anlamlı azalma görülürken katalaz değerlerinde anlamlı olmasa da azalma saptanmıştır. Karaciğerdeki histopatolojik değişiklikler açısından tedavi gruplarından 25 mg/kg Quercetin ve 50 mg/kg Quercetin anlamlı düzelmeler gözlenmişken 100 mg/kg Quercetin verilen grupta düzelmek kısmı olmuştur. Quercetin, hembiyokimyasal hemde histolojik açıdan anlamlı düzelmeler sağladığı göz önüne alındığında İskemi-reperfüzyon hasarının beraberinde getirdiği komplikasyonlarda ve mortalitede azalmaya yol açabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: İskemi, reperfüzyon, quercetin

ABSTRACT

Uylaş, M. U. The protective effect of quercetin on liver ischemia reperfusion. Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Thesis for specialization in medicine, Eskişehir 2014. Totally, hepatic ischemia-reperfusion-treated 50 Sprague-Dawley male rats weighed 200-250 g were used to investigate the corrective effect on the ability of antioxidants in the liver. Rats were divided into five groups including sham group, hepatic I / R group, hepatic I / R + 25mg / kg quercetin group, hepatic I / R + 50 mg / kg quercetin group and hepatic I / R + 100 mg / kg quercetin group consisted of 10 rats. Sham group received only laparotomy. After laparotomy, all rats from the other groups received 2 h reperfusion following 1 h ischemia in liver. After reperfusion, blood samples for aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) and liver tissue samples for Malondialdehyde (MDA) as well as histopathological assessment. Significantly decreased serum AST, ALT, MDA levels were found in treatment groups, also, catalase values were found lower but it was not statistically significant. Significant improvement for histopathological changes in liver was seen in treatment groups including 25 mg / kg of quercetin and 50 mg / kg quercetin groups whereas only partial improvement was observed in 100 mg / kg quercetin group. Considering the significant biochemical and histological effects of quercetin, we concluded that it can decrease the complications and mortality due to ischemia-reperfusion damage.

Key Words: ischemia, reperfusion, quercetin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 . İskemi-reperfüzyon hasarının patofizyolojisi	4
2.1.1. PMNL aktivasyonu	5
2.1.2. Kompleman sisteminin aktivasyonu	6
2.1.3. Sitokinlerin rolü	7
2.1.4. Endotel hücresi ve NO	7
2.1.5. Araşidonik asit metabolitlerinin rolü	8
2.1.6. Serbest oksijen radikalleri üretimi	8
2.2. Antioksidan savunma sistemleri	11
2.2.1. Antioksidan enzimler	11
2.3. Quercetin	12
2.3.1. Quercetin'in yapısı ve kaynakları	13
2.3.2. Quercetin'in farmakokinetik özellikleri	13
2.3.3. Quercetin'in istenmeyen yan etkileri	14
2.3.4. Quercetin'in etki mekanizması	14
2.3.5. Quercetin'in terapötik kullanım alanları	17
2.3.6. Quercetin preparatları ve dozajı	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Deney Hayvanları	20

	Sayfa
3.2. Çalışma Grupları	20
3.2.1. Cerrahi Prosedür ve Tedavi	20
3.3. Biyokimyasal İnceleme	21
3.4. Histopatolojik Değerlendirme	21
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	21
4. BULGULAR	22
4.1. Biyokimyasal Sonuçlar	22
4.2. Oksidatif Stres Parametreleri	26
4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	29
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALT	Alanin transaminaz
AST	Aspartat transaminaz
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
COX	Siklooksijenaz
ET	Endotelin
GSH	Glutasyon
GSHPx	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutatyona
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
H2O2	Hidrojen peroksit
HO ₂	Peroksil radikali
ICAM	İntersellüler adhezyon molekülü
İ/R	İskemi reperfüzyon
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LT	Lökotrienler
MDA	Malondialdehid
MIP	Makrofaj inflamatuvar protein
NO	Nitrik Oksit
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH ⁻	Hidroksil radikali
PAF	Platelet aktive edici faktör
PECAM	Trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü
PG	Prostoglandin
PMNL	Polimorfonükleer lökosit
PSGL	P-selektin glikoprotein
Q	Quercetin
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TXA ₂	Tromboksan A ₂

VCAM

Vasküler hücre adhezyon molekülü

XO

Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER

- 2.1. İskemik hasarın yol açtığı doku hasarının mekanizmaları
- 2.2. PMNL hücrelerinin aktivasyonu sonucu gelişen olaylar ve migrasyon olayı
- 2.3. Serbest oksijen radikallerinin doku hasarına yol açma mekanizmaları
- 2.4. Quercetin kimyasal yapısı

GRAFİKLER

- 4.1. AST Medyan Değerlerinin Dağılım Grafiği.
- 4.2. AST Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği
- 4.3. ALT Medyan Değerlerinin Dağılım Grafiği.
- 4.4. ALT Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği.
- 4.5. Katalaz Medyan Değerlerinin Dağılım Grafiği.
- 4.6. Katalaz Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği
- 4.7. MDA (doku) Medyan Değerlerinin dağılım Grafiği.
- 4.8. MDA (doku) Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği
- 4.9. MDA (serum) Medyan Değerlerinin Dağılım Grafiği
- 4.10. MDA (serum) Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği

RESİMLER

- 4.11. Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama.
- 4.12. İskemi grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama
- 4.13. İskemi+25 X grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama
- 4.14. İskemi+50 grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama.
- 4.15. İskemi+100 grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama.

TABLÖLAR

- 2.1. Bazı besin maddelerindeki quercetin içeriği
- 4.1. AST Medyan Değerlerinin Tablosu (U/L)
- 4.2. ALT Medyan Değerleri (U/L)
- 4.3. Medyan Katalaz Değerleri (10^3 U / mg)
- 4.4. MDA (doku) Medyan Değerleri (nmol / mg doku).
- 4.5. MDA (serum) Medyan Değerleri (nmol / ml)

1. GİRİŞ

Arterlerde herhangi bir nedenle oluşan tıkanma sonucu, dokuya giden kan akımının bozulması iskemi (İ) olarak tanımlanır. İskemi sonucunda hücre ölümleri ve organ yetmezlikleri çok sık rastlanan bulgulardır [1]. İskemi sırasında kan akımının kesilmesi ve taşınan oksijen miktarındaki azalma anaerobik metabolizmayı devreye sokar.

Dokuda laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi de hücre hasarına katkıda bulunur [2]. İskemik dokuda kan akımının normale dönmesiyle enerji kaynağının geri gelmesine ise reperfüzyon (R) denir.

İskemik dokunun reperfüzyonu dokunun hayatta kalabilmesi için çok önemlidir fakat reperfüzyon, iskemik dokuya reperfüzyon hasarı olarak da tanımlanan ek hasarlar getirir [3]. Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönmesi ile O₂ kaynaklı serbest radikallerin İ/R hasarında önemli Karaciğer iskemi ve reperfüzyonda Quercetin'in koruyucu etkisi rol oynadığı pek çok çalışmada gösterilmiştir [1, 2].

İskemi ve reperfüzyon hasarını açıklayan pek çok mekanizma bildirilmiştir. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun değişmesi, ATP'nin azalması, hücre içi Ca⁺² artışı ve hücre iskeleti ile zar fosfolipitlerinin bozulmasına öncülük eden proteaz ve fosfatazların aktive olması sonucu aşırı miktarda SOR oluşarak, oksidatif strese neden olmaktadır [1].

En iyi tanımlanmış flavonoidlerden biri olan Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon), sebze ve meyvelerde bulunan bileşiktir. Başlıca elma, soğan, brokoli, çilekçiller, yeşil bezelye ve çayda bulunur. Batı diyeti yaklaşık 25 mg/gün flavonoid içerir; Quercetin 16 mg/gün ile bu diyetle flavonoidlerin en büyük bileşenini oluşturur.

Flavonoidler ve Quercetin gıdalarda genellikle glikozid şeklinde bulunan büyük moleküllü yapılardır. Bu özelliklerinden dolayı barsaklarda emilmeleri zordur. Gastrointestinal sistemde serbest fenolik kısım ayrılır. Çünkü bunların bağırsaktan emilebilmesi için küçük molekül ağırlıklı formlara dönüşmeleri gerekir.

Bağırsaklarda bulunan mikroorganizmalar, flavonoid glikozidlerinin çözülmesini gerçekleştirirler. Yaklaşık %1'i bozulmadan, büyük bir kısmı ise çeşitli hidroksiaromatik asitlere dönüştürülerek böbreklerden atılır [4]. Quercetin

distribüsyon yarı ömrünün 3.8 saat, eliminasyon yarı ömrünün 16.8 saat olduğu bildirilmiştir [5].

Quercetin diğer flavonoidlere göre antioksidan etkinliği oldukça güçlüdür. Flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme özelliklerine ilave olarak antiinflamatuvar, antiviral, antialerjik, antitrombotik, antiaterosklerotik, antitümoral etkileri içeren çeşitli biyolojik özellikleri de vardır.

Flavonoidler XO, fosfolipaz-A₂, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu, lökosit adhezyonun ve aktivasyonunun azaltılması, mast hücresi degranülasyonunun inhibisyonu gibi etkileriyle antiinflamatuvar özellik gösterirler.

Flavonoidler ve özellikle Quercetin, karsinogenlerin biyoaktivasyon sürecini inhibe ederek ve LDL oksidasyonunun engellenmesi yoluyla anti-karsinogenik ve anti-aterosklerotik etkilidirler [4].

Flavonoidlerin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkileri epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir ve flavonoid alımının mortalite ile ters ilişkili olduğu bulunmuştur [5]. Radikal aracılı hasar sonucu oluşması muhtemel pek çok hastalıktan korunmada flavonoidlerin etkin bir rol oynayabilecekleri düşünülebilir.

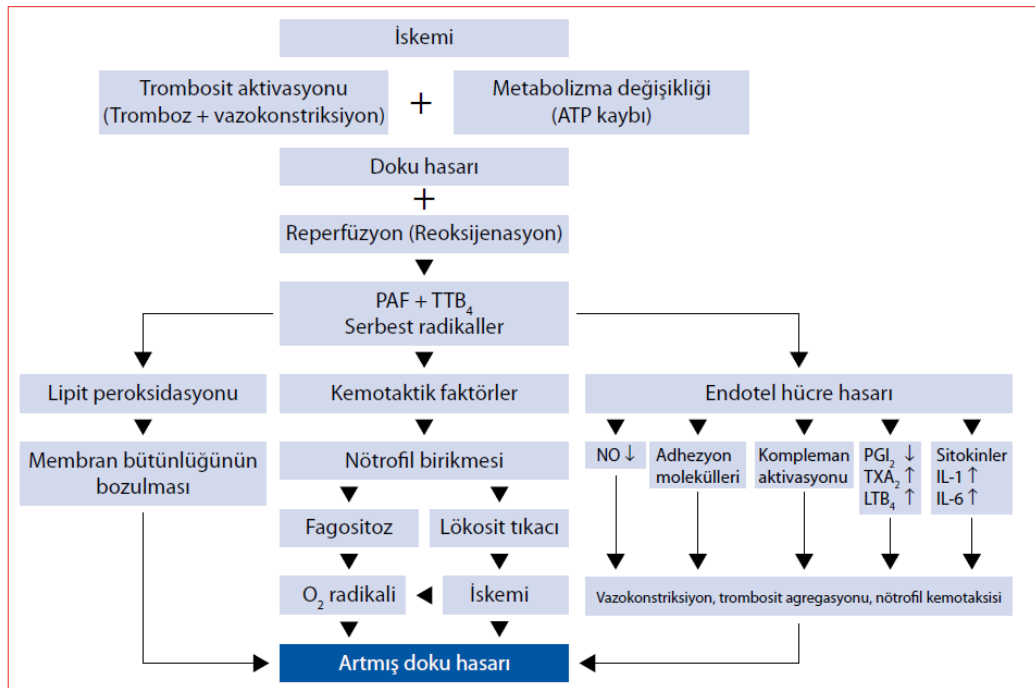
Bu bilgilerin ışığı altında, çalışmamız karaciğer iskemisi hastalığının deneysel modeli oluşturularak karaciğer dokusunda oluşacak hasarın mekanizmasını açıklamaya ve bu hasarı tedavi etmeye yönelik planlanmıştır. Çalışmanın sonunda Quercetin hastalığın oluşum mekanizmasındaki iyileştirici etkisi ile ilgili bir bulgu elde edilirse, Quercetin klinikte bu hastalığın tedavisinde daha etkin olarak kullanılabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi

İskemi, arteriyel veya venöz kan akımının azalmasına bağlı olarak organ ve dokuların yetersiz perfüzyonu nedeniyle ilgili organ veya dokunun yetersiz oksijenlenmesi olarak tanımlanmaktadır ve iskemi sonrasında hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitler birikmesi nedeniyle hücre ölümü gelişmektedir. İskeminin bu zararlı etkilerinin ortadan kaldırılması ve biriken toksik metabolitlerin temizlenmesi için gereken yeniden kanlanma (reperfüzyon) olayı ise iskeminin yaptığından çok daha büyük boyutta bir hasara yol açmaktadır [6].

İskemi-reperfüzyon (IR) olayı tipik olarak PMNL aktivasyonuna, serbest oksijen radikalleri artışına, sitokin salıverilmesinde artışa, eikonasoid üretiminde artışa ve kompleman sisteminin aktivasyonuna yol açar ve IR hasarında bu mekanizmalar rol almaktadır [7]. Hücresel yapılar içerisinde reperfüzyon hasarına karşı en duyarlı olanlar membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir [8] (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. İskemik hasarın yol açtığı doku hasarının mekanizmaları [9].

Karaciğer cerrahisinde büyük hepatik kitlelerin rezeksiyonu, karaciğer travması, vasküler rekonstrüksiyonlar ve transplantasyon gibi çeşitli işlemlerde

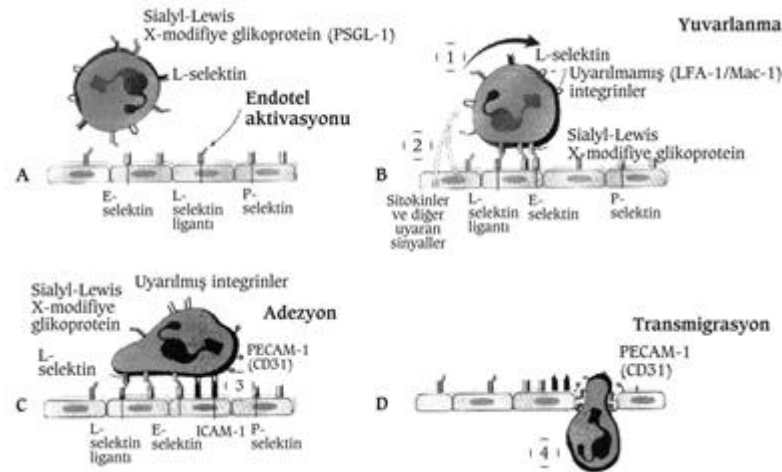
iskemik dönemler uzun sürebilir. Kan akımı ve oksijen desteği tekrar sağlandığında ise reperfüzyon, iskemik dönemin neden olduğu doku hasarını hücresel seviyede arttırır. Bu IR hasarı özellikle de transplantasyon ve karaciğer cerrahisinde karaciğerin canlılığı üzerine doğrudan etkilidir [10, 11].

2.1.1. PMNL Aktivasyonu

İskemi reperfüzyon sonrasında lökosit adezyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adezyonu meydana gelmekle birlikte [12] endotel hücreleri gibi PMNL hücreleri de yüksek oranda serbest oksijen radikalleri üretme kapasitesine de sahiptir. PMNL hücrelerinin IR olayında (i) mikrovasküler oklüzyon, (ii) serbest oksijen radikalleri üretimi, (iii) vasküler permeabilitede artış ve (iv) sitokin salıverilmesinde artış gibi mekanizmalarla doku hasarına yol açtığı öne sürülmektedir [13].

Burada rol alan PMNL hücrelerinin aktive olması ve göç etmesi için aracılık eden adezyon molekülleri lökositlerde ve endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Bu adezyon molekülleri selektinler olarak adlandırılmaktadır ve L-, P- ve E-selektin olmak üzere üç alt tipi vardır. IR durumunda endotelde P-selektin ekspresyonu artar ve PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur.

Daha sonra lökosit beta2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki intersellüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasındaki etkileşim sonucunda lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Bunun sonrasında da trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktive olmuş lökositler damar dışına çıkınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. PMNL hücrelerinin aktivasyonu sonucu gelişen olaylar ve migrasyon olayı .

Aktive lökosit cevabı şu mekanizmalarca gerçekleştirilir;

1. Fosfolipaz A₂ aktivasyonuna bağlı olarak araşidonik asit metabolitleri (prostoglandin ve lökotrienler) üretilir,
2. Degranülasyon nedeniyle lizozomal enzimler serbestleşir, ve
3. Serbest oksijen radikallerinin üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku hasarı açısından güçlü mediyatörleridir ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirir.

Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya etkisini hafifletmeye yönelik bu inflamatuvar cevap sonucu mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü meydana gelir. Görevini tamamlayan lökositler ise apoptoza uğrar ve lenfatik dolaşım ile ortamdaki uzaklaştırılırlar.

2.1.2. Kompleman Sisteminin Aktivasyonu

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da bu sistemin IR sırasında aktive olduğu bilinmektedir. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonucunda proinflamatuvar komponentler (C3a, C5a, iC3b ve C5b-9) oluşur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler.

Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasının yanı sıra, C5a makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı güçlendirir.

Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1), interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1), E-selektin ve P-selektin'dir [14].

Bunun yanı sıra C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı (cGMP) azaltarak vasküler tonusu bozar [16].

Kompleman sistemi 3 yoldan biri ile aktive olur:

1. Antikor bağımlı klasik yol;
2. Alternatif yol;
3. Mannoza bağımlı lektin yolu.

Aktive olan komplemanlar hem direkt olarak membran atak komplekslerinin oluşumu ve depolanmasını hem de indirekt olarak kemotaktik ajan ve proinflatuar sitokinlerin üretiminin uyarılmasını sağlarlar. Sonuçta lökositlerin adezyonuna, migrasyonuna ve sinuzoidler içine toplanmasına neden olurlar [17, 18].

Kompleman inhibitörlerinin çeşitli organlarda IR hasarını azalttığı gösterilmiştir. Örneğin bir çalışmada C5a reseptör antagonistinin sıçanlarda oluşturulan hepatik IR hasarında nötrofil infiltrasyonunu, karaciğer hasarını ve mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir [19].

2.1.3. Sitokinlerin Rolü

Sitokinler IR hasarı durumunda inflammatuar cevabın hem başlamasında hem de devam etmesinde önemli bir role sahiptir. IR hasarı açısından üzerinde en çok çalışma yapılan sitokinler proinflatuar etkili sitokinler olan TNF α , IL1 ve IL-6'dır.

Bu sitokinler kompleman faktörlerle birlikte PMNL hücreleri etkileyerek nötrofillerin karaciğeri infiltre etmesi ve reaktif oksijen metabolitleri ve çeşitli proteazların saliverilmesi suretiyle iskemik hasarın devam ettirilmesi ve şiddetinin artmasından sorumludur [20].

2.1.4. Endotel Hücresi ve NO

Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri serbest oksijen radikalleri için hem

potansiyel bir hedef hem de serbest oksijen radikalleri için üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan başlıca maddeler olan endotelin (ET) ve NO üretimini sağlar. NO arterlerde ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğiliminde iken venlerde bunun tersi söz konusudur. IR hasarında ET/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon ve venöz vazodilatasyon olur [21].

Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak özellikle lipit radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik konsantrasyonda üretilen NO aktivitesinin sonlanması esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃⁻) oksitlenme ile olur.

Serbest oksijen radikallerinin aksine, nitrik oksidi ortamdaki temizleyen herhangi bir enzim yoktur. Bunun yerine, indüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO konsantrasyonunun artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'nun dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrede proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler [22].

2.1.5. Araşidonik Asit Metabolitlerinin Rolü

İskemiyle birlikte sitozolik kalsiyum seviyesinin yükselmesi fosfolipaz A₂ aktivasyonu ile sonuçlanır ve hücre membran fosfolipidlerinden araşidonik asit sentezi meydana gelir. Araşidonik asit başlıca iki yol ile metabolize olur. Siklooksijenaz (COX) yolu ile prostoglandinler (PG) ve tromboksan A₂ (TXA₂), lipooksijenaz yoluyla lökotrienler (LT) oluşur. İskemiyle birlikte meydana gelen sitozolik kalsiyum yükselmesi aynı zamanda hem lipooksijenazı hem de siklooksijenazı aktive eder [23].

2.1.6. Serbest Oksijen Radikalleri Üretimi

Eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller serbest radikal veya reaktif metabolit olarak adlandırılır. Reaktif metabolitler kararsız yapılar olduğu için başka bir molekül veya atom ile etkileşime girerek bir elektron alma veya verme eğilimindedirler. Diğer bir deyişle bu metabolitlerin reaktiviteleri oldukça yüksektir [24].

Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin temel endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranıdır.

Normal şartlar altında organizmadaki reaktif oksijen molekülleri oluşumu antioksidan mekanizmalarla denge halinde devam ederken stres durumlarında bu denge reaktif oksijen molekülleri lehine bozularak sonuçta sitotoksositeye neden olur [25].

Moleküler oksijen (O_2) iki tane eşleşmemiş elektronu olan bir moleküldür. Biyolojik sistemlerle ilişkili oksijen türevli serbest radikallerin başlıcaları;

1. Süperoksit anyonu (O_2^-);
2. Peroksil radikali (HO_2);
3. Hidroksil radikali (OH);
4. NO;
5. Singlet oksijen (1O_2)

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H_2O_2) indirgenir. Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir.

Hidrojen peroksinin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir:

1- H_2O_2 , katalaz (KAT) veya glutatyon peroksidaz (GSHPx) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür.

2- H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında toksik OH radikaline dönüşür (Fenton reaksiyonu).

Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir ve büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Makromoleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir.

Herhangi bir OH radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle OH radikalının oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir [26].

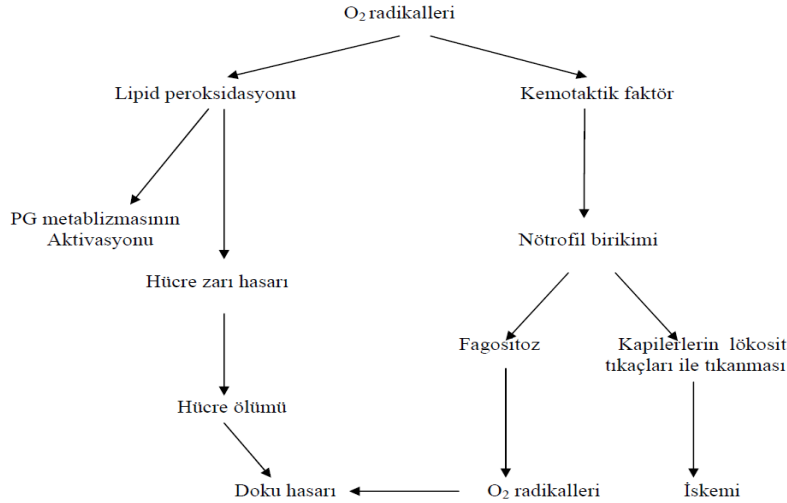
Serbest radikallere bağlı gelişen hücresel hasar 3 mekanizmayla gelişebilir:

1. Lipid Peroksidasyonu: Serbest oksijen radikalleri, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Hidroksil radikali membran lipidleri ile çift bağ yapar ve böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (malondialdehit, dien konjugatları gibi) oluşur. Eritrosit membranlarının, lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması ile bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar [27].

2. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu: Serbest oksijen radikalleri, aminoasit yan zincirleri oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel önemi olan enzimlerde bozulmalar ortaya çıkar [28].

3. DNA hasarı: Serbest oksijen radikalleri, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tipte hücre ölümü olur (Şekil 2.3)

Yapılan çalışmaların birçoğunda IR hasarını azaltmak için reaktif oksijen metabolitlerini inhibe eden çeşitli antioksidan maddeler denenmiştir. Bu antioksidanlar arasında α - tokoferol, allopurinol, N-Asetil Sistein, enzimatik süperoksit dismutaz ve katalaz, antosiyanidinler, alfa lipoik asit ve melatonin sayılabilir [29-34].



Şekil 2.3. Serbest oksijen radikallerinin doku hasarına yol açma mekanizmaları [35].

2.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmanın pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. Vücutta serbest radikallerin oluşumu ve bunların meydana getirdiği zararı önlemek için bir çok mekanizma vardır ve bunlar antioksidan mekanizmalar olarak bilinirler. Antioksidanlar serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek hücreleri hasara karşı korurlar [36].

Antioksidan mekanizmalar endojen ve ekzojen olmak üzere ikiye ayrılırlar.

1- Endojen antioksidanlar: Bunlar organizmada kendisi veya öncül maddesi bulunan antioksidanlardır. Örneğin; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), α -tokoferol, β -karoten, glutatyon (GSH), vitamin C, bilirubin ve melatonin.

2- Eksojen antioksidanlar: Organizmaya dışarıdan alınan antioksidanlardır. Örneğin; Allopurinol, folik asit, soya fasulyesi tripsin inhibitörü, difenilin iyodür ve desferoksamin.

2.2.1. Antioksidan Enzimler

Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Bu reaksiyonla SOD, süperoksitten OH⁻'nin oluşumunu engellemektedir. Ancak SOD artışı nedeniyle H₂O₂ seviyesi yükselirse SOD

prooksidan madde halini alır. Organizmada oksidan stres arttığı zaman SOD etkinliği de artar. Özellikle antioksidan sistemlerin aktivitelerinde azalma olduğu klinik durumlarda SOD aktivitesi artar. SOD hücrelerde iki şekilde bulunur. Birincisi daha çok sitoplazmada bulunup bakır ve çinko ihtiva ederken diğeri mitokondriada bulunur ve manganez içerir [37, 38].

Katalaz (CAT)

CAT, demir içeren ve H₂O₂'yi su ve oksijene dönüştüren bir enzimdir. CAT birçok hücrede bulunmakla birlikte nöronlarda ve kardiyak hücrelerde az miktarda bulunur. Genellikle karaciğer, böbrek veya beyin peroksizomlarında ve subsellüler organellerin iç kısmında bulunur.

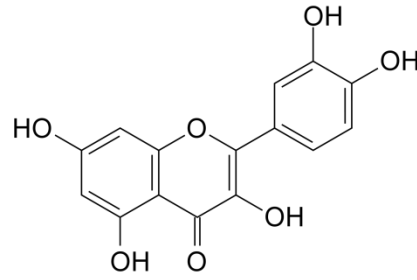
Glutasyon Peroksidaz (GPx)

GSH, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonunu sağlayan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen antioksidandır (41). Hücre içi GSH, antioksidan olarak bulunan tiol bileşiğidir. GPx enzimi selenyuma bağlı bir enzim olup, GSH elektronları kopararak H₂O₂'ye ve okside glutatyona (GSSG) dönüştürür [39].

Endojen yada eksojen oluşan radikaller bir taraftan GSH düzeyini azaltarak öte yandan da GSH metabolizmasına bağlı enzimlerin aktivitesini inhibe ederek alveoler makrofaj fagositozunu bozar ve lökositlerin kemotaksisini engelleyerek hasarın ilerlemesine neden olurlar [40].

2.3. QUERCETIN

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) 3 halka ve 5 hidroksil grubundan oluşan flavonoidlerin en yaygın bulunanıdır (Şekil 2.4). Quercetin, flavonol adı verilen flavonoid sınıfının bir üyesidir ve rutin, hesperidin, naringenin ve tangeritin gibi diğer birçok flavonoidin temel omurgasını oluşturur. Quercetin'in kendisi bir aglikon veya aglukondur ve yapısında bir karbonhidrat içermez ve aslında rutinin şekersiz formu olarak da adlandırılmaktadır [41].



Şekil 2.4. Quercetin'in kimyasal yapısı

2.3.1. Quercetin'in Yapısı Ve Kaynakları

Quercetin, sarı renkte, acı bir tadı olan kristalize katı bir maddedir. Suda çözünmemekle birlikte alkolde kısmen çözünür ve asetik asit ve sulu alkali solüsyonlarda tam çözünür. Quercetin, flavonoid adı verilen doğada kendiliğinden oluşan bileşikler grubuna dahildir ve bu flavonoidler bitkilerde yaygın şekilde bulunmaktadır.

Quercetin, özellikle de soğanda yüksek oranda olmak üzere meyveler, tohumlar, sebzeler, çay, kahve, eğreltiotu ve doğal boyalar gibi birçok bitki ve besin ürünüde bulunmaktadır.(Tablo 2.1). Quercetin genelde rutin adlı flavonoid glikozidin hidrolizi ile elde edilse de kimyasal sentezi de mümkündür [42, 43].

Flavonoidler gibi fitokimyasalların biyosentezinin bitkilerin kendi ortamlarına karşı bir savunma cevabı olduğu bilinmektedir. Flavonoidler genelde UV güneş ışığından ve lipid peroksidasyonundan koruyucudur [44].

Tablo 2.1: Bazı besin maddelerindeki quercetin içeriği [45]

Besin maddesi	Quercetin içeriği (mg/100g)
Siyah/yeşil çay	2
Kırmızı elma	4
Kapari	180
Kuzukulağı	86
Dereotu	55
Kırmızı soğan	32
Yaban mersini	15

2.3.2. Quercetin'in Farmakokinetik Özellikleri

Quercetin, ince barsaktan ve nispeten zayıf olarak absorbe edilir. Barsaktaki mikroflora flavonid glikozidi quercetin ve şekere hidrolize eder ve sonrasında

quercetin enterohepatik sistem içerisine absorbe edilir. Enjekte edilmiş olan quercetin yaklaşık %25'inin ince barsaktan absorbe edildiği bildirilmektedir [46].

Absorbe edilen quercetin portal dolaşım ile karaciğere taşınır ve burada ilk geçiş metabolizmasına uğrar. Quercetin ve metabolitleri vücuttaki neredeyse tüm dokulara dağılır ve plazmada albumine sıkıca bağlanır.

Quercetin oral alımından sonra pik plazma düzeyine 0,7 ile 7,0 saat içerisinde ulaşılırken eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 25 saattir [47]. Quercetin yağlı bir diyet içerisinde tüketildiğinde eliminasyonun önemli ölçüde geciktiği bildirilmiştir [48].

2.3.3. Quercetin'in İstenmeyen Yan Etkileri

Quercetin oral uygulaması sonrasında en sık bildirilen istenmeyen yan etkiler bulantı gibi gastrointestinal etkiler, baş ağrısı ve ekstremitelerde hafif karıncalanma hissi olmakla birlikte oral yolla genelde iyi tolere edilmektedir. İntravenöz quercetin uygulaması ise bulantı, kusma, diaforez ve dispneye yol açabilir.

Bunun yanı sıra quercetin'in toksik ve hatta mutajenik olabileceğine dair çelişkili sonuçlar bulunmaktadır, ancak bunun aksini savunan çalışmalar da bulunmaktadır [49, 50].

Quercetin ayrıca çeşitli ilaçlarla etkileşime girerek onların etkilerini değiştirebilir. Quercetin içeren greyfurt suyunun ve quercetin kendisinin yapılan çeşitli çalışmalarda kanda estradiol [51], siklosporin [52] ve digoksin [53] düzeylerini artırdığı ve in vitro olarak bakterilerdeki DNA giraz bölgesine bağlanarak teorik olarak kinolonlarla bu bölgeye bağlanmak için yarışmaya girerek etkisini inhibe edebileceği [54] gösterilmiştir.

2.3.4. Quercetin'in Etki Mekanizması

Antioksidan Etki

Quercetin'in belki de en iyi tanımlanmış olan etkisi antioksidan özelliğidir. Quercetin vücudu reaktif oksijen metabolitlerine karşı korumada en güçlü flavonid gibi görünmektedir. Serbest radikallerin hücresel fonksiyonları etkilemesi açısından en önemli olay, sonuçta hücre ölümüne yol açan lipid peroksidasyonudur. Canlı organizmalar bu hücresel ölümün gerçekleşmesini engellemek için bazı enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptir.

Bu savunmada yer alan enzimlerden en önemlileri de süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidazdır (GPx). Ayrıca diğeri bir savunma sistemi de vitamin C, vitamin A ve oksidasyon zincirini kıran quercetin gibi fitokimyasallardır. Son olarak da lipazlar, proteazlar, DNA tamir enzimleri ve transferazlar da oluşan hasarı tamir edip membranları yeniden yapılandıran mekanizmalardır [55, 56].

Direkt Radikal Süpürücü Etki

Serbest radikallerin oluşumu ister kazara ister kasıtlı olsun çok sayıda hastalıkta önemli yer tutmaktadır ve serbest radikalleri süpürücü etkisi olduğu gösterilmiş olan quercetin bu tür hastalıklarda ve iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarında koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir [57].

İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Aktivitesine Etki

Quercetin, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesini etkileyerek iskemi-reperfüzyon hasarının azalmasına neden olmaktadır. Nitrik oksit, endotelial hücreler ve makrofajları da içeren birçok hücre tarafından üretilmektedir.

Nitrik oksitin erken dönemde yapısal NOS tarafından saliverilmesi kan damarlarının dilatasyonunun sağlanmasında önemli olmakla birlikte iNOS tarafından makrofajlardan salıverdirilen nitrik oksidin yüksek konsantrasyonlarda bulunması oksidatif hasara yol açabilir.

Bu durumda aktive makrofajlar nitrik oksitle birlikte süperoksit anyonu üretme kapasitelerini de büyük ölçüde artırır. Nitrik oksit de serbest radikallere reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur. Oldukça toksik olan peroksinitrit ise doğrudan LDL oksidasyonuna neden olarak hücre membranında irreversible hasara yol açar.

Quercetin ise bu serbest radikalleri ortamdaki süpürdüğü için nitrik oksitle reaksiyona giremezler ve daha az hasar oluşur [58, 59].

Ksantin Oksidaz İnhibisyonu

Ksantin oksidaz yolağı özellikle de iskemi-reperfüzyon olayında görülen oksidatif hasarda oldukça önemlidir. Ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidaz ksantinün ürik aside metabolize edilmesinde önemli enzimlerdir.

Fizyolojik koşullar altında mevcut olan enzim ksantin dehidrogenaz iken oksidatif stres ve iskemik koşullar altında ksantin oksidaza dönüşür. Quercetin ise ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ederek oksidatif hasarı azaltır [60, 61].

Lökosit İmmobilizasyonunun Azaltılması

Normal koşullarda lökositler endotel duvarından serbest şekilde hareket edebilirken iskemi ve inflamasyon durumunda özellikle de endotelial kökenli mediyatörler ve kompleman faktörleri olmak üzere çeşitli faktörler lökositlerin endotel duvarına adezyonuna yol açarak onları immobilize eder ve nötrofil degranülasyonuna neden olur.

Sonuçta ortama salıverilen oksidan ve inflamatuvar mediyatörler doku hasarına yol açar. Quercetin ve diğer flavonoidlerin ise reperfüzyon sırasında immobilize lökosit sayısını azaltarak koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir [62].

Gen Ekspresyonunun Değiştirilmesi

Quercetin'in radikal süpürücü etkisi nöroprotektif kapasitesini tam olarak açıklayamadığından bu maddenin biyolojik etkilerinden sorumlular çok sayıda hücrel sinyal olayı olabileceği öne sürülmektedir [63].

Quercetin'in kronik inflamatuvar hastalıklar patogenezinde ve oksidatif strese rol alan ve antiviral ve antimikrobiyal etkiye de sahip olan TNF- α üretimini ve gen ekspresyonunu doza-bağımlı şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Quercetin varlığında endojen TNF- α üretiminin azalması, flavonoidlerin immün cevabı düzenleme ve antiinflamatuvar aktivite sergileme kapasitesine sahip olduğu anlamına gelmektedir [64].

Bu proinflamatuvar özelliğinin yanı sıra TNF- α immün hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve ölümünde de önemli etkilere sahiptir ve TNF- α inhibisyonu bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisi açısından geçerli bir seçenektir. Quercetin'e bağlı TNF- α baskılanması NF- $\kappa\beta$ aktıvasyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar sitokinlerin stimülasyonuna neden olabilir.

Quercetin'in antiproliferatif etkisi olduğu ve bu etkiyi hücre siklusu ve hücre büyümesini düzenleyici genleri etkileyerek yaptığı öne sürülmüştür [65].

Diğer Enzim Sistemleri Üzerine Etkiler

Quercetin, kalsiyum düzenleyici bir enzim olan kalmodulini antagonize etmek suretiyle kalmodulin bağımlı ATPazlar veya fosfolipazlar gibi enzimleri inhibe ederek membran permeabilitesini etkilemenin yanı sıra mast hücrelerinden histamin sekresyonunu da azaltır [66]. Fosfolipazların inhibisyonu araşidonik asit metabolitlerinin düzeylerinin azalmasına yol açar [67].

2.3.5. Quercetin'in Terapötik Kullanım Alanları

Alerji, Astım, Saman Nezlesi, Ürtiker

Quercetin, muhtemelen mast hücre membranlarını stabilize etmek suretiyle histamin ve diğer alerjik/inflamatuar maddelerin üretimini inhibe ettiğinden bazı alerjik hastalıklarda fayda sağlayabilir [68, 69].

Antibakteriyel Aktivite

Quercetin, solunum yolları, gastrointestinal sistem, deri ve idrar yollarında enfeksiyona yol açtığı bilinen neredeyse tüm bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktiviteye sahiptir [70].

Artrit

Quercetin hem siklooksijenaz hem de lipooksijenaz enzimlerini inhibe etmek suretiyle inflammatuar mediyatörlerin oluşumunu azalttığından artritte fayda sağlayabilir [71].

Kanserler

Kanser etyolojisi multifaktöriyel olsa da reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin patofizyolojide önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra bitki ağırlıklı beslenmenin birçok kansere karşı koruyucu olduğunu gösteren in vitro ve in vivo çalışmalar bulunmaktadır [72]. Quercetin'in de meme, kolon, prostat ve akciğer kanseri gibi durumlarda kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir [73].

Koroner Kalp Hastalıkları

Antioksidan etkiye sahip quercetin, oksidize kolesterole bağlı gelişen koroner kalp hastalığına karşı koruyucudur. Yapılan bir çalışmada lavonoid tüketiminin yaşlı erkeklerde koroner kalp hastalıklarına bağlı ölüm riskini azalttığı gösterilmiştir [74].

Ayrıca, quercetin alımıyla plazma kolesterol düzeyi arasında ters korelasyon olduğu [75] ve quercetin'in hayvanlarda platelet agregasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir [76].

Diyabetik Komplikasyonlar

Quercetin, glukozun diyabetik komplikasyonlarından (retinopati, nöropati, nefropati, katarakt vb) sorumlu sorbitole dönüşmesini sağlayan aldoz redüktaz enzimini inhibe etmek suretiyle diyabetik hastalarda faydalı olabilir [77].

Nörodejeneratif Hastalıklar

Quercetin'in Alzheimer hastalığı ve diğer bazı nörodejeneratif hastalıklarda doku hasarına yol açan oksidatif stresten beyin hücrelerini koruduğu öne sürülmüştür [78].

Osteoporoz

Yapılan bir çalışmada çay tüketen ve tüketmeyen yaşlı kadınlar arasında kemik mineral dansitesi karşılaştırılmış ve çay tüketen kadınlarda kemik mineral dansitesinin daha yüksek bulunması çaydaki quercetin içeriğine bağlanmıştır [79].

Diğerleri

Quercetin serbest radikalleri nötralize etmek suretiyle katarakt ve makular dejenerasyon gibi bazı göz hastalıklarını önleyebilir veya tedavi edebilir. Ayrıca ksantin oksidaz inhibitörü etkisi ürik asit üretimini azaltacağından gut semptomları açısından fayda sağlayabilir. Peptik ülser açısından ise mukus sekresyonunu artırarak gastroprotektif bir etkide bulunabilir.

2.3.6. Quercetin Preparatları Ve Dozajı

Normal bir diyetle sebze ve meyve tüketimi ile günde 15-40 mg quercetin alınabilir. Quercetin'in öne sürülen olumlu etkilerinden faydalanabilmek için daha çok sebze ve meyve tüketilerek diyetteki toplam bioflavonoid miktarı artırılabilir veya quercetin besin desteği olarak dışarıdan alınabilir. Ancak terapötik amaçla quercetin kullanımı için genelde yüksek dozlar (250-500 mg günde 3 kez) gerektirmektedir. Quercetin piyasada kapsül veya tablet formunda bulunmaktadır ve tedavi edici günlük doz hastalığa göre değişmekle birlikte erişkinlerde genelde günlük 250-500 mg civarındadır.

Tüm bu bilgilerin ışığı altında, quercetin'in antioksidan etki mekanizması ile karaciğer iskemi-reperfüzyonu açısından fayda sağlayabileceği hipotezini kurduk ve sıçanlarda oluşturduğumuz hepatik iskemi-reperfüzyon modelinde üç farklı dozda uyguladığımız quercetin'in bu hayvanlarda IR hasarı üzerine olası olumlu etkilerini histolojik ve/veya biyokimyasal açıdan değerlendirdik.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Hayvanlar

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28.12.2012 tarih ve 311 sayılı onayı alınarak, ESOĞÜ Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi (TİCAM) laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışmada, ağırlıkları 250-300 gr. arasında değişen Sprague-Dawley cinsi 50 adet erkek sıçan kullanıldı. Deneysel hayvanlar standart laboratuvar koşullarında, standart sanayi yemi ve çeşme suyuyla beslendiler. Çalışmada 5 grup oluşturulmuş ve her bir gruptan 10 adet sıçan histoloji ve biyokimya araştırmaları için kullanılmıştır.

3.2. Çalışma Grupları

Deneysel hayvanlar randomize olarak 5 gruba ayrılmıştır:

Grup 1. Kontrol (n=10)

Grup 2. İ/R (n=10)

Grup 3. İ/R + Q (n=10) 25mg/kg

Grup 4. İ/R + Q (n=10) 50mg/kg

Grup 5. İ/R + Q (n=10) 100 mg/kg

3.2.1. Cerrahi Prosedür ve Tedavi

Sıçanlara 8 saatlik açlık sonrası 50 mg/kg ketamin ile birlikte 20mg/kg xylasin intraperitoneal (ip) enjeksiyon ile uygulanarak genel anestezi altında uyutulduktan sonra operasyon masasına alınarak abdominal median laparotomi uygulanmıştır.

5 çalışma grubu oluşturulmuştur: 1. grup Sham operasyon yapılan hayvanlardan oluşmaktaydı. 2. Grupta (İskemi/reperfüzyon (İR)) 1 saat total hepatik iskemi ve ardından 2 saat reperfüzyon uygulanmıştır. 3. grupta (İR+QUERCETİN 25) iskemi-reperfüzyondan 30 dk önce Quercetin 25 mg/kg intraperitoneal yolla verilmiştir. 4. Ve 5. Gruplarda ise (İR+QUERCETİN 50 ve 100) iskemi-reperfüzyondan 30 dk önce 50 ve 100 mg/kg Quercetin intraperitoneal yolla verilmiştir.

3.3. Biyokimyasal İnceleme

Biyokimyasal değerlendirmeler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalında yapıldı. Kan örnekleri silikonlu tüplere alındı. 5 dakika 6500 devirde santrifüj sonrası serumlar ayrıldı. Örneklerden; ALT (alanin aminotransferaz), AST (aspartat aminotransferaz), CAT (katalaz) MDA(malondialdehit) doku ve serum düzeyleri ticari kitlerle çalışıldı.

3.4. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik analizler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalında yapıldı. Karaciğerin değişik bölgelerinden alınan doku parçaları % 10'luk formaldehit ile fikse edildi. Su ile yıkamayı takiben giderek artan derecelerdeki etil alkollerden geçirilerek dehidratasyon sağlandı. Ksilollerden geçirilerek dokular ışık geçirir hale getirildikten sonra eritilmiş sıvı parafinlerden geçirilip sonuçta parafin bloklar elde edildi. Parafin bloklardan mikrotom ile alınan 4-5 µm kalınlığındaki seri kesitler hematoksilin-eozin boyama tekniği ile boyanarak binoküler ışık mikroskobu altında kör olarak değerlendirildi.

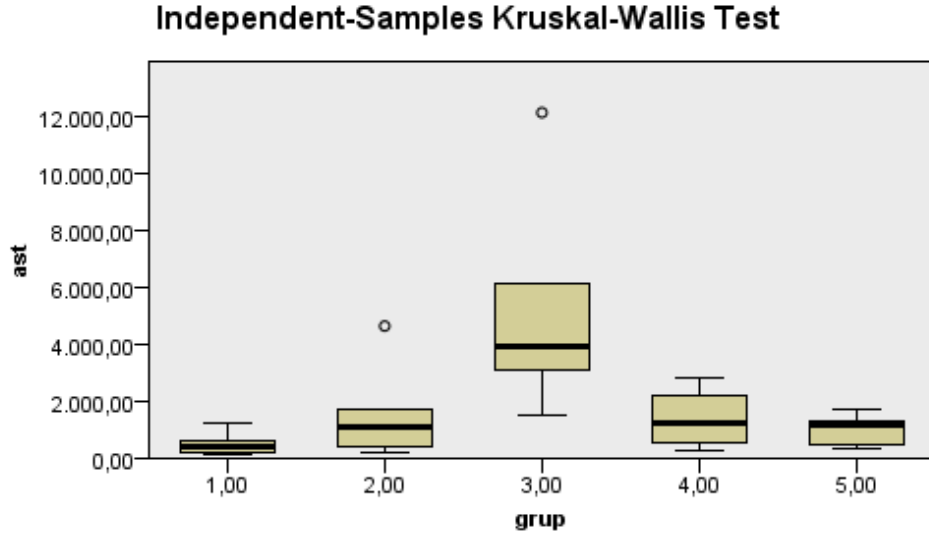
Histolojik değerlendirmede iltihabi hücre infiltrasyonunun varlığı (PMNL ve MNL), kanama, karaciğer damarlarında konjesyon, hepatositlerde dejenerasyon bulgularının (hidropik dejenerasyon, vakuolar dejenerasyon ve nekroz) varlığı yarı kantitatif olarak skor puanı vermek yoluyla değerlendirildi. Grupları temsil eden örneklerden dijital kamerayla mikro görüntüler alındı.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapıldı. Veriler bilgisayar ortamında IBM SPSS 20.0 versiyonunda değerlendirildi. Gruplardaki değerlerin normal dağılım gösterip göstermediğinin değerlendirilmesinde Shapiro Wilks testi kullanıldı. Normal dağılım göstermediği için non parametrik testlerden birden fazla ortalamının kıyaslanmasında kullanılan Kruskall Wallis testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ alındı.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Sonuçlar



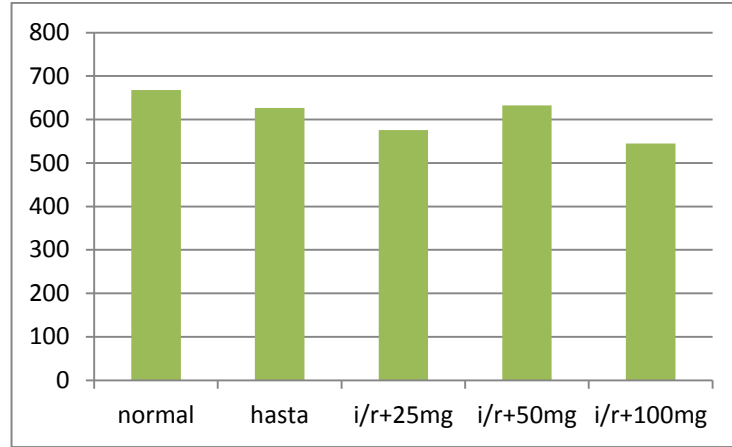
Total N	35
Test Statistic	17,151
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,002

1. The test statistic is adjusted for ties.

Grafik 4.1: AST Medyan Değerlerinin Dağılım Grafiği.

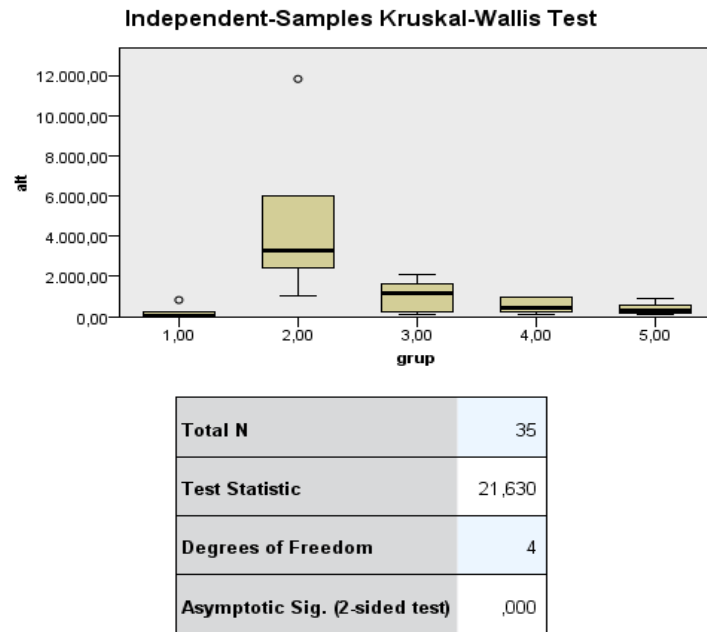
Tablo 4.1: AST Medyan Değerlerinin Tablosu (U/L)

	AST medyan (min-maksimum)	İstatistik değer
Grup1	393.00(125.00-1206.00)	17,15; p:0.02
Grup2	3918.00 (1525.00-12120.00)	
Grup3	1208.00 (252.00-2801.00)	
Grup4	1178.00 (328.00-1720.00)	
Grup 5	1095.00 (164.00-4625.00)	



Grafik 4.2: AST Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği

AST düzeyleri açısından gruplar arasında Grup 3 ve Grup 5 te, Grup 2 ye göre azalma olduğu görüldü. AST sonuçlarına istatistiksel açıdan baktığımızda ilaç dozu arttıkça anlamlı düşüş olduğu görüldü. ($p < 0.05$)

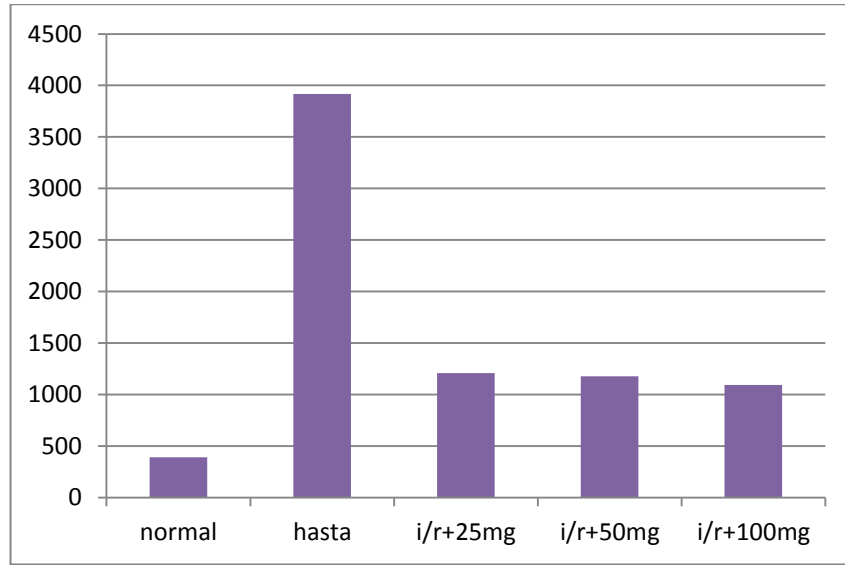


1. The test statistic is adjusted for ties.

Grafik 4.3 : ALT Medyan Değerlerinin Dağılım Grafiği.

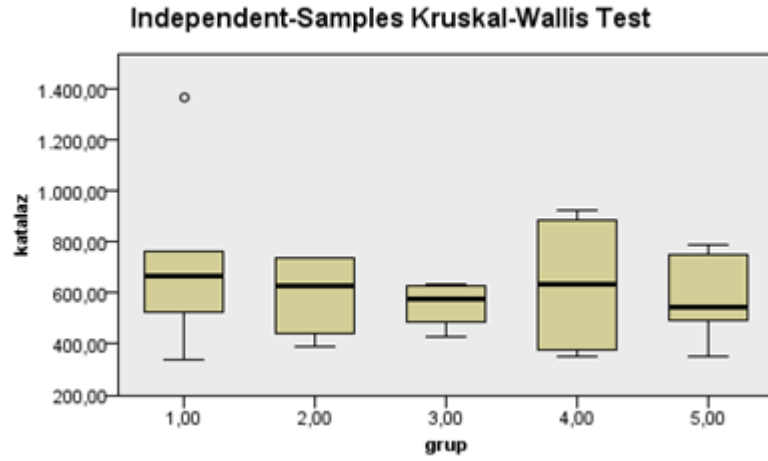
Tablo 4.2: ALT Medyan Değerleri (U/L)

	ALT medyan (min-maksimum)	İstatistik değer
Grup1	67 (35-835)	21,63; p:0.000
Grup2	3318(1027-11823)	
Grup3	1158 (100-2084)	
Grup4	433 (93-958)	
Grup 5	342 (134-878)	



Grafik 4.4: ALT Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği.

ALT düzeyleri açısından gruplar arasında Grup 3-4-5 te Grup 2 ye göre düşük izlendi. ALT seviyesine istatistiksel açıdan baktığımızda sadece 100 mg/kg Quercetin verilen grup 5te istatistiksel anlamlı düşüş olduğu görüldü. (p<0.05)



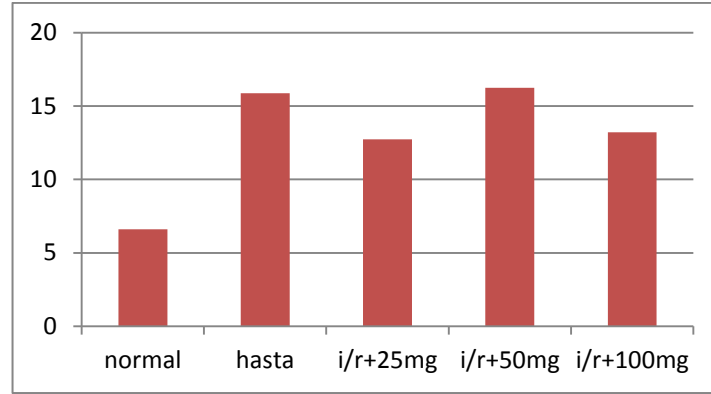
Total N	35
Test Statistic	2,136
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,711

1. The test statistic is adjusted for ties.
2. Multiple comparisons are not performed because the overall test does not show significant differences across samples.

Grafik 4.5: Katalaz Medyan Değerlerinin Dağılım Grafiği.

Tablo 4.3: Medyan Katalaz Değerleri (10³ U / mg)

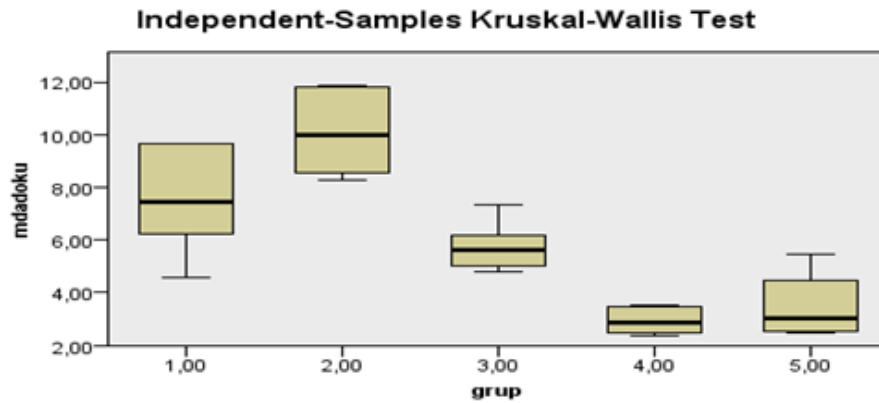
	Katalaz medyan (min-maksimum)	İstatistik değer
Grup1	668.0(339.48-1366.67)	2.13; p:0.711
Grup2	626.66 (392.84-739.76)	
Grup3	575.79 (426.66-633.82)	
Grup4	632.20 (351.68-925.60)	
Grup 5	545.04 (350.75-791.10)	



Grafik 4.6: Katalaz Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği

Katalaz düzeyleri açısından gruplar arasında Grup 3 ve Grup 5 te , Grup 2 ye göre azalma olduğu görüldü. Katalaz sonuçlarına istatistiksel açıdan baktığımızda tüm gruplar arasından anlamlı fark saptanmadı.($p>0.05$)

4.2. Oksidatif Stres Parametreleri



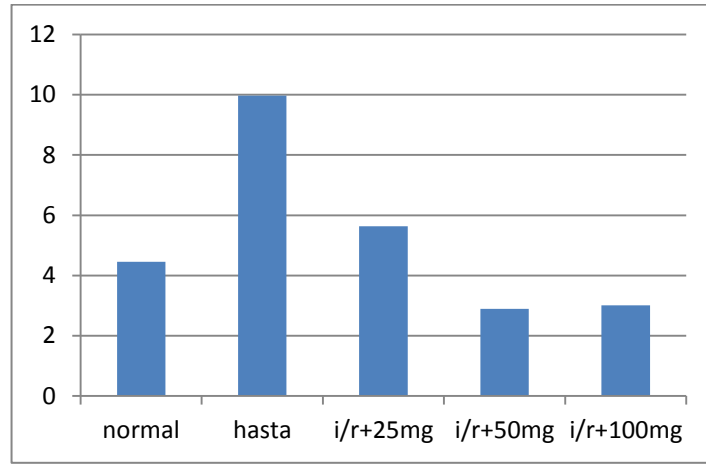
Total N	35
Test Statistic	28,512
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,000

1. The test statistic is adjusted for ties.

Grafik 4.7 : MDA (doku) Medyan Değerlerinin dağılım Grafiği.

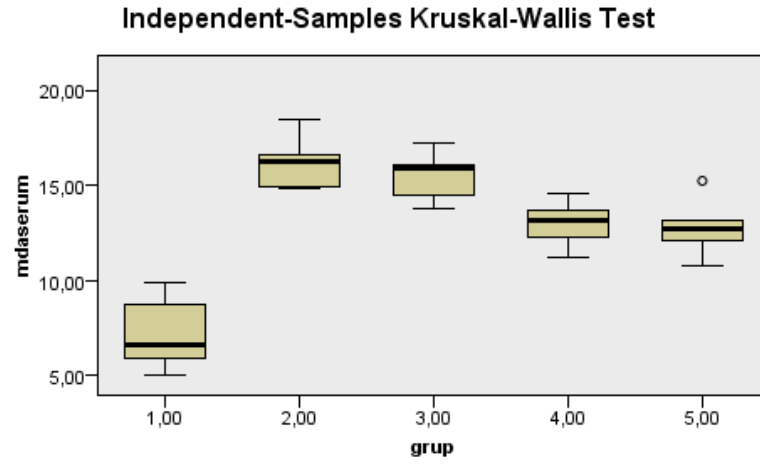
Tablo 4.4: MDA (doku) Medyan Değerleri (nmol / mg doku).

	MDA (doku) medyan (min-maksimum)	İstatistik değer
Grup1	4.46 (4.59-9.66)	28,51; p:0.000
Grup2	9.97 (8.25-11.85)	
Grup3	5.63 (4.78-7.31)	
Grup4	2.89 (2.35-3.52)	
Grup 5	3.01 (2.47-5.44)	



Grafik 4.8: MDA (doku) Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği

MDA (doku) düzeyleri açısından gruplar arasında Grup 3-4-5 te Grup 2 ye göre düşük bulundu. Grup 4 te verilen 50 mg/kg Quercetin ve Grup 5 e verilen 100 mg/kg Quercetin MDA (doku) üzerine anlamlı derecede etkisi olduğu görüldü. ($p < 0.05$)



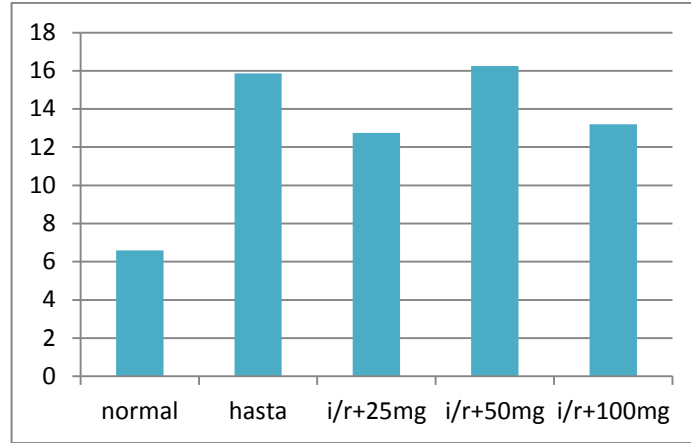
Total N	35
Test Statistic	27,968
Degrees of Freedom	4
Asymptotic Sig. (2-sided test)	,000

1. The test statistic is adjusted for ties.

Grafik 4.9 : MDA (serum) Medyan Değerlerinin Dağılım Grafiği

Tablo 4.5: MDA (serum) Medyan Değerleri (nmol / ml)

	MDA(serum) medyan (min-maksimum)	İstatistik değer
Grup1	6.60 (4.99-9.90)	28,51; p:0.000
Grup2	16.25 (14.81-18.45)	
Grup3	15.87 (13.79-17.26)	
Grup4	13.20 (11.21-14.56)	
Grup 5	12.74 (10.79-15.23)	



Grafik 4.10: MDA (serum) Medyan Değerlerinin Sütun Grafiği

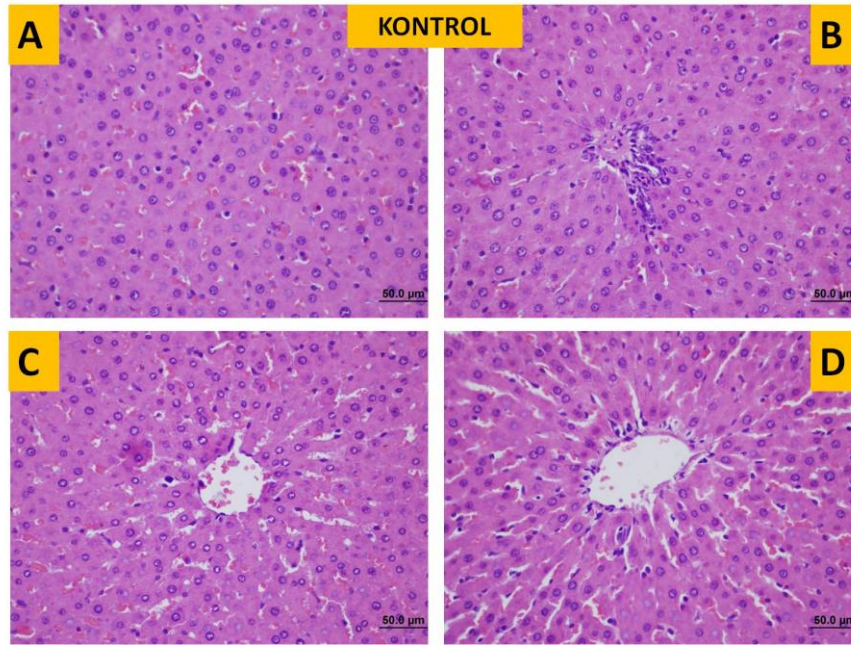
MDA (serum) düzeyleri açısından gruplar arasında Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 de Grup 2 ye göre düşük olduğu görüldü. MDA (serum) örneklerine istatistiksel açıdan baktığımızda sadece Grup 3 de anlamlı azalma olduğu görüldü. ($p < 0.05$)

Veriler bilgisayar ortamında IBM SPSS 20.00 versiyonunda değerlendirildi. Gruplardaki değerlerin normal dağılım gösterip göstermediğinin değerlendirilmesinde Shapiro Wilks testi kullanıldı. Normal dağılım göstermediği için non parametrik testlerden birden fazla ortalamanın kıyaslanmasında kullanılan Kruskal Wallis testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ alındı.

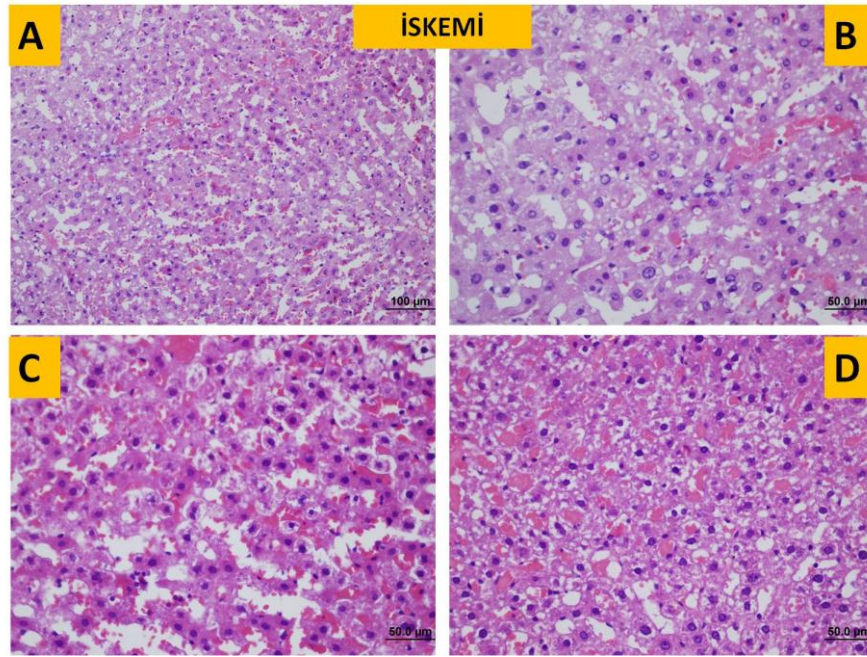
4.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

İskemi uygulanan Grup 2 de hepatositlerin çekirdeklerinin normal biçim ve boyanma özelliklerini kaybederek küçük, yoğun ve düzensiz biçimli hale geldikleri görülmektedir. Hepatositlerin sitoplazmalarında vakuolleşmeler dikkati çekmektedir. Sinüsoidlerin genişlediği ve hepatositlerin kordon diziliminin bozulduğu izlenmektedir. İskemi+25 mg/kg Quercetin uygulanan Grup 3 de hepatositlerin çekirdeklerinin normal biçim ve boyanma özelliklerinin kısmen kaybolduğu, kısmen de küçük, yoğun ve düzensiz biçimli hale geldikleri görülmektedir. Hepatositlerin sitoplazmalarında vakuolleşmeler dikkati çekmektedir. Sinüsoidlerin genişlediği ve içlerinin eritrosit kümeleriyle dolu olduğu izlenmektedir. Yer yer mononükleer hücre gruplarının oluştuğu görülmektedir. İskemi+50 mg/kg Quercetin uygulanan Grup 4 de hepatositlerin gerek çekirdeklerinin gerekse sitoplazmalarının normal biçim ve boyanma özelliklerini korudukları görülmektedir. Yer yer sinüsoidal konjesyon alanları izlenmektedir. İskemi+100 mg/kg Quercetin uygulanan Grup 5 de bazı

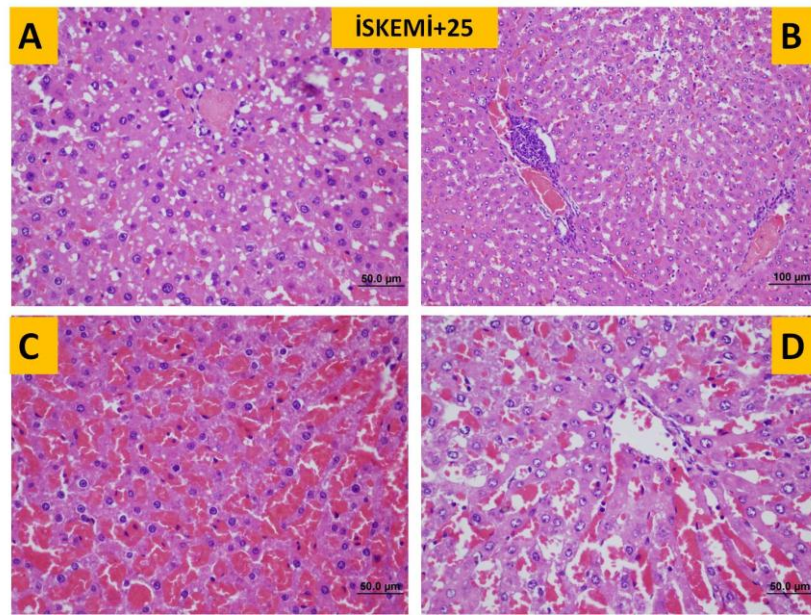
bölgelerde normal histolojik özellikler görülmesine karşın diğer bölgelerde hepatositlerin çekirdeklerinin normal biçim ve boyanma özelliklerini kaybederek küçük, yoğun ve düzensiz biçimli hale geldikleri görülmektedir. Hepatositlerin sitoplazmalarında boyanma farklılıkları dikkati çekmektedir. Bazı bölgelerde mononükleer hücre artışlarının olduğu izlenmektedir. Sinüsoidlerde yer yer konjesyon vardır. Histopatolojik olarak Grup 3 de tedaviye az yanıt varken grup 4 de tam yanıt izlenmiştir. Grup 5 de ise tedavinin yanında harabiyet de mevcuttur. Hazırlanan seri kesitlerin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi ile elde edilen bulgular aşağıda Resim 1-5’de görülmektedir.



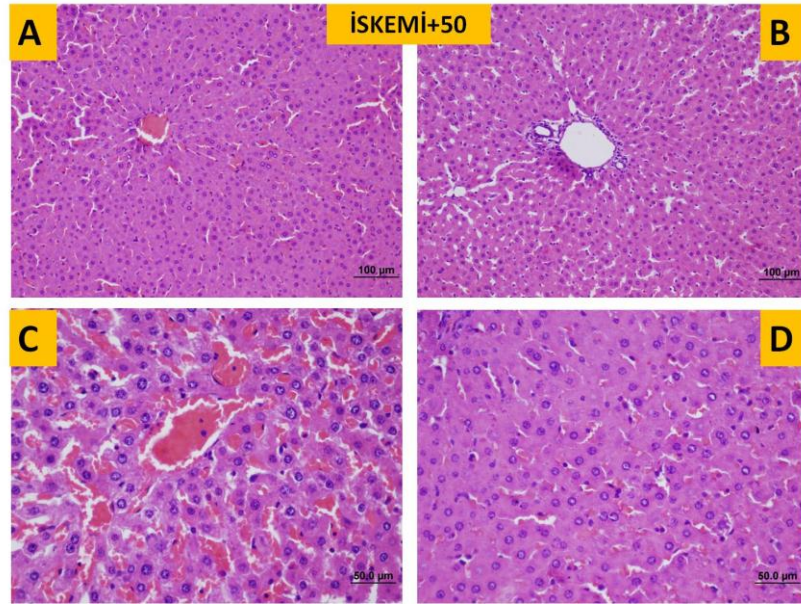
Resim 4.11: Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama.



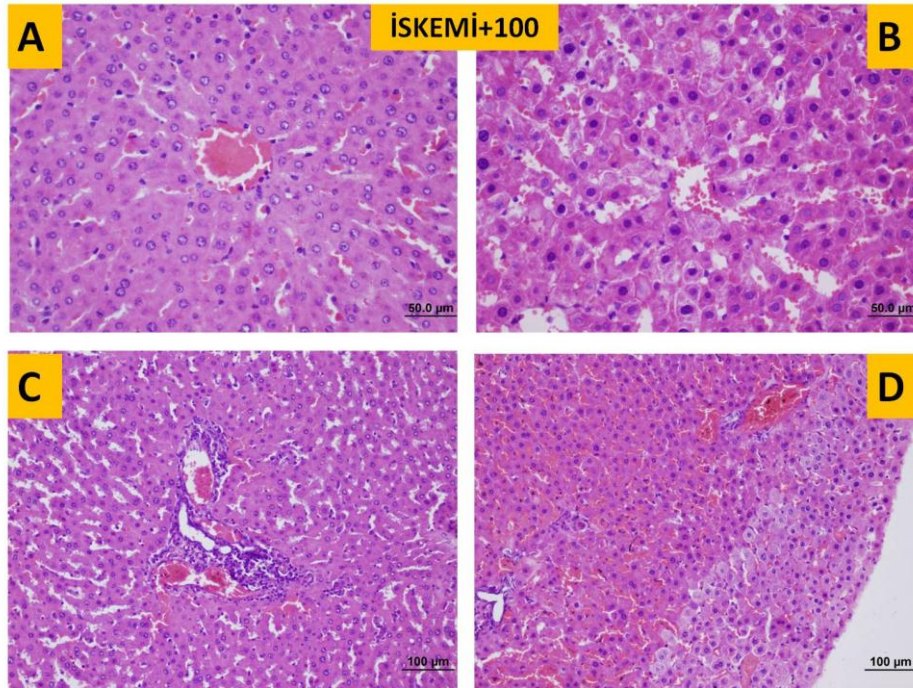
Resim 4.12: İskemi grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama.



Resim 4.13: İskemi+25 X grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama.



Resim 4.14 İskemi+50 grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama.



Resim 4.15: İskemi+100 grubuna ait karaciğer kesitleri. Hematoksilin eozin boyama.

5. TARTIŞMA

Bir organ veya dokuya kan akımının kesilmesi ve daha sonraki reperfüzyon süreci, hücre ölümü ve organ disfonksiyonuna yol açan bir dizi patolojik reaksiyonu başlatır. Son yıllarda araştırma tekniklerinin gelişmesiyle birlikte bu patolojik tablonun ortaya çıkmasında asıl önemli rolü reperfüzyon sürecindeki olayların oynadığı anlaşılmıştır. Reperfüzyon hasarı sonucu oluşan fonksiyon bozukluğu organdan organa değişiklikler göstermekle beraber, hasardan oksijen radikallerinin sorumlu olduğu belirlenmiştir.

Major karaciğer cerrahisi esnasında kan kaybı mortalite ve morbidite hızı açısından önemli olduğundan, karaciğerin vasküler izolasyonu ile kan kaybı en aza indirilmelidir. Vasküler izolasyon ile de İ/R hasarı oluşmaktadır. Bu da bize İ/r hasarının önemini daha da arttırmaktadır.

İskemi-reperfüzyon hasarına yol açan mekanizmaların anlaşılması ve yeni tedavi modellerinin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. İskemik doku hasarından birçok faktör sorumlu tutulmasına rağmen, serbest oksijen türevi radikalleri ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet}), bu hasarın esas kaynağı olarak kabul edilmektedir.

Hücre içinde oluşan oksijen türevi radikaller, iskeminin derecesine bağlı olarak çeşitli derecede hücre hasara yol açmaktadır. Bu hasardan etkilenen yapılar ise hücre ve organellerin membranları, DNA ve enzimlerdir. İskemi olayında serbest radikallerin bu derecede önem kazanması, araştırmacıları değişik dokularda iskemi ve serbest radikal metabolizmasını araştıran çalışmalara yönlendirmiştir [80].

Organizmada SOR'nin zararlı etkilerini en aza indirmek amacıyla enzimatik ve non enzimatik savunma sistemleri bulunmaktadır. Normal şartlar altında süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz içeren enzimatik savunma sistemleri SOR'nin oluşturduğu oksidatif hasarı önlerler.

Serbest radikal oluşum hızı bu radikalleri etkisizleştirme hızı ile aynı olduğu sürece oluşan radikallerden, organizma etkilenmemektedir. Buna karşılık antioksidan savunma azalır ya da zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü asarsa bu denge bozulmakta ve SOR'lerine bağlı zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır. [81].

İskemi sonrası dokularda inflamatuvar hücrelerin, özellikle nötrofil ve mast hücrelerinin reperfüzyon hasarında sorumlu olduklarının bulunması ile bu hücrelerin

doku infiltrasyon ve aktivasyonlarının engellenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmış ve doku hasarı azaltılabilmıştir [82-88].

İskemi reperfüzyon hasarının sorumlu olduğu düşünölen patofizyolojik mekanizmaları bloke edeceği düşünölen birçok hepatosit koruyucu ajan; allopurinol, roskovitin, α -tokoferol, mannitol, dopamin, prostoglandin, aktive karbon hemoperfüzyonu, glukagon, melatonin, karnitin, klorpromazin, aprotonin, metil prednizolon, deferoksamin, siklosporin, katalaz, aspartik asit, ubiquinon, trombosit aktive edici faktör antagonistleri, ATP, verapamil, nifedipin, süperoksit dismutaz tanımlanmış ve bunların İRH üzerine iyileştirici etkileri deneysel İR modellerinde araştırılmıştır [89-92].

İ/R hasarının mekanizması komplekstir ve karaciğer hasarında oksijenden tureyen serbest radikallerin bu değişikliklerin ana nedeni olduğu düşünölmektedir.[93] Jaeschke ve ark. karaciğer İ/R hasarının iki ayrı fazda olduğunu gostermiştir. [94-96]

Başlangıç fazı, reperfüzyonun ilk iki saatinde gercekleşir ve kupffer hucrelerinin aracılık ettiği oksidatif stresle karakterizedir. Bu dönemde kupffer hucrelerinden salıverilen reaktif oksijen metabolitleri bir dizi karmaşık inflamatuvar olaylar zincirini başlatarak notrofilleri aktive eder.

Aktive olmuş notrofiller ise endotel hucrelerine yapışarak myeloperoksidaz, elastaz, kollojenaz gibi çeşitli proteazlar ve SOR salıverirler ve hasarı daha da kotuleştirirler. Dawson ve ark. hucre icinde en önemli SOR kaynağının mitokondri olduğunu ve O₂ radikalinin notrofil aktivasyonunu uyararak hepatosit olumune yol actığını gostermişlerdir.[97]

Normal sartlarda lökositler damar icinde serbestçe hareket ederler. İskemi ve yangı sırasında endotel kaynaklı mediatörler ile lökosit –endotel iliskisi sonucunda lökositler adhezyon sonucu immobilize olurlar ve dokuya migrasyonla infiltre olup toksik ürünler ile doku hasarına neden olurlar.

Lökositlerin adhezyonlarının değişik basamaklarda engellenmesi ile İ/R hasarının önlendiği değişik araştırmalarda gösterilmistir [98]. Quercetin'in reperfüzyon sırasında endotele yapışan olan lökosit sayısını azalttığı ve toksik lizozomal ürünlerin degranölasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir [99]

I/R'a bağlı doku hasarını başlatan en önemli faktör SOR'dir. Aerobik canlılar metabolizmaları sırasında fizyolojik olarak oksidatif strese maruz kalırlar. Dokuların tükettiği oksijenin büyük bir kısmı (%95) aerobik metabolizma için kullanılırken, %5'inin SOR'ne çevrildiği tahmin edilmektedir.

Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^\cdot), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) vardır.

Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü meydana getirmektedirler [100].

Oksijen hücre fonksiyonları için kritik bir öneme sahiptir. Oksijen yokluğu, anaerobik metabolizma ve lokal laktik asit konsantrasyonunun artışına neden olur. Meydana gelen asidoz, normal enzim kinetiklerini değiştirerek daha az sayıda yüksek enerjili fosfat bağlı oluşumuna neden olur ve sonuçta hücre homeostazını devam ettirebilmek için gerekli olan enerjiden yoksun kalır [101].

Dokular hipoksiye farklı sürelerde dayanıklılık gösterirler. Çizgili kaslar saatler süren iskemiden etkilenmezken, nöronal hasar iskemi oluşumundan sadece dakikalar sonra meydana gelmektedir [102].

Önceki yapılan çalışmalar incelendiğinde iskemi ve reperfüzyon süreleri farklılık göstermektedir. Korosec ve Jezernik farklı iskemi sürelerini uygulayarak rat karaciğerinde meydana gelen erken sellüler ve ultrastrüktürel değişiklikleri araştırdıkları bir çalışmada, 30 dk iskemi sonucu parankimde sadece hücrelerde tek tek ayrılma, 120 dk iskemi sonrası ise dokuda irreversible değişiklikler meydana geldiğini bildirmişlerdir. 40 dk iskemi ve sonrasında 60 dk reperfüzyon uygulandığında ise parankimde hasarın daha belirgin olduğunu ve bu hasarın da reperfüzyon uygulanan gruplarda daha fazla olduğunu saptamışlardır. Ayrıca 1 saat iskemi uygulanmasının karaciğer hücrelerinin ATP içeriğinde %80 azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir [103].

Biz de bu bilgiler ışığında hazırladığımız deneysel modelde 2 saat sonra oluşan irreversible değişiklikleri quercetinle tedavi etmekte.. Çalışmada quercetin verilen grupta anlamlı derecede düzelme olduğu görüldü. Bu sonuç bize daha ileri çalışmalar yapılabileceğini göstermektedir.

Karaciğer İR hasarında ışık mikroskopik inceleme yapıldığında, NL infiltrasyonu, bölgesel hemoraji ve nekroz, konjesyon, sinuzoidlerde genişleme, bölgesel hepatoselüler vakuolizasyon, hepatosit şişmesi, ultrastrüktürel inceleme yapıldığında ise mitokondriyal yapıda bozulma, şişme, boyanma farklılıkları, NL birikimi gözlenir.

Serumda yapılan incelemede ALT ve AST düzeyleri artmış, karaciğer dokusu homojenatında yapılan biyokimyasal çalışmalarda ise; MPO, MDA, TBARS, protein karbonil (PO) düzeyi (proteinlerin oksidatif hasarının spesifik göstergesi) artmış, GSH düzeyi azalmış olarak bulunur [104].

Crockett ve ark.ları yaptığı çalışmada, karaciğer İR uygulanmış grupta sinuzoidal konjesyon, sitoplazmik vakuolizasyon, hepatosellüler nekroz ve nötrofil infiltrasyonu gözlemiş, ALT düzeylerini yüksek olarak bulmuşlardır [105].

Ingrott ve ark.ları İR uygulanmış karaciğer dokusunda polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, hepatosit nekrozu, sinuzoidal genişleme , ALT ve AST düzeylerinde artış saptamışlardır [106].

Peralta ve ark.ları İR uygulanmış karaciğer dokusunda yaygın hepatosit nekrozu , hemoraji, nötrofil infiltrasyonu , ALT ve AST düzeyi yükselmesi bulmuşlardır [107].

Bizim çalışmamızda benzer şekilde İR grubunda inflamasyon, sinuzoid genişlemesi ve konjesyon, yaygın hepatosit nekroz alanları izlendi. Serum AST ve ALT düzeylerinde artış bulundu.

Biyokimyasal seviyedeki birçok çalışma ve hayvan deneyleri, yeniden oksijenasyonun zararlı oksijen radikallerinin fazla miktarda üretilmesine yol açtığını, bunun da doğal antioksidan savunma mekanizmasını tahrip ettiğini ve başta reperfüze olan organ olmak üzere tüm vücutta oksidatif yükü artırdığını göstermiştir [108]

İskemi reperfüzyon hasarının önlenmesi için pek çok çalışma yapılmıştır. SOR üretiminin ksantin oksidaz inhibisyonu yapan allopurinol ile önlenmesi, radikallerin ortamdan temizlenmesi için vitamin E ve C, süperoksit dismutaz enzimi, resveratrol, karvedilol, Quercetin ve koenzim Q kullanılması ile İ/R hasarı azaltılabilmistir [109].

Çalışmamızda hepatik arterleri, portal ven ve safra yolunun klemplenmesiyle oluşturulan karaciğer İ/R'u sonucu karaciğer dokusunda meydana gelen patolojik değişiklikler biokimyasal olarak değerlendirildi ve güçlü serbest oksijen radikali supurucusu olarak bilinen Quercetin'in bu hasara karşı olası koruyucu etkileri araştırıldı.

İ/R hasarı sonrasında karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmek için değişik yöntemler kullanılabilirse de bugün için bunların en çok kabul gören ve en çok kullanılan AST, ALT, LDH aktivitesi tayinidir. Karaciğer hasarında bu enzimlerin aktivitesinin arttığı bilinmektedir.

Yabe ve ark. karaciğerde İ/R sonucunda ALT ve AST düzeylerinin artırdığını ve bu artışın iskemi reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallerin dokuda meydana getirdiği hasara bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.[110] Çalışmamızda İ/R sonucunda AST ve ALT düzeylerinin anlamlı derecede arttığı görülmüştür.

Çalışmamızda, karaciğer hücre hasarını gösteren karaciğer enzimleri olan AST, ALT seviyelerinin tedavi edilen grupta anlamlı olarak daha düşük çıktığını ve bu da bize doku hasarının Quercetin ile tedavi edilen grupta daha az olduğunu göstermektedir

Serbest radikallerin etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte en önemli etkilerinden biri lipid peroksidasyonu yoluyla hücre membranının hasarı olarak görünmektedir. Serbest radikaller ayrıca yaygın yangısal hasar oluşturabilirler ve doku hasarına yardım eden çeşitli yangısal mediatörleri çekebilirler [111-113].

Varolan tedavilerin her biri spesifik olayları inhibe ettiği için, aynı tedavide farklı hedeflere yönelerek birden fazla basamağı etkileyen tedavi stratejisine gereksinim vardır [114].

Flavonoidler ksantin oksidaz, fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu, lökosit adhezyonunun ve aktivasyonunun azaltılması, mast hücresi degranülasyonunun inhibisyonu gibi etkileriyle antiinflamatuvar özellikte gösterirler .Bir flavonoid olan Quercetin'in hücrede biyolojik etkilerini iyi araştırılmıştır ve İskemi reperfüzyon hasarının pek çok basamağında etkisi olması muhtemeldir [111-112].

Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin etkisi sonucu membrane yapısında bulunan çoklu doymamıs yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olay olup bir radikalın yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından bir hidrojen atomunun (H^+) uzaklaştırılması ile baslar.

Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehittir . Lipid peroksidasyonunun başlamasında asıl etkili olan radikalın $OH\bullet$ radikali olduğu kabul edilmektedir [115-116]. Quercetin serbest radikale bağlı hasardan korunmayı farklı yollara yapmaktadır.

Bu yollardan biri direkt radikal temizleme özelliğidir. Quercetin $OH\bullet$ radikalini [117,118] ve onun prekürsörü olan O_2^- radikalini [119] temizlemesinin yanında önemli bir özelliği de, lipid peroksil radikalini parçalayarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır. [120]. Radikallerin flavonoidler ile aşağıdaki reaksiyonla oksidize edilmeleri onları daha stabil hale getirir ve reaktivitelerini düşürür [111,112]



Serbest oksijen radikallerinin direkt ölçümü, bu maddelerin stabil olmamaları ve kısa olan yarı ömürleri nedeniyle mümkün olmamaktadır. Lipoperoksidasyonun sabit bir son ürünü olan MDA, hücre membranındaki lipidler üzerindeki serbest radikal etkisinin ölçülebilen kimyasal bir belirteçdir.

Komplet ve inkomplet iskemi uygulanan deneysel modellerde yapılan bazı çalışmalarda, MDA'nın hücre duvarı ayrışmasının göstergesi olduğu ortaya konmuştur. Bu sebeple, MDA düzeylerinin ölçümü, İ/R olgularında serbest radikal aktivitesini tespit etmek için kullanılmaktadır

Quercetin ayrıca Fe ve Cu gibi geçiş metallerini selatlayarak bu iyonların Fenton reaksiyonu yolu ile H_2O_2 'den $OH\bullet$ radikali oluşumunu engelleyerek lipid peroksidasyonunu önlemektedir [2,118]. Flavonoidlerin lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve MDA düzeylerini anlamlı olarak düşürdükleri gösterilmiştir [2,111,112,121,122].

Biz de çalışmamızda oksidan hasarın derecesini belirlemek ve kullandığımız maddelerin bu hasarı önlemedeki başarısını saptamak amacıyla denek gruplarında oksidatif stres göstergesi MDA düzeyini çalıştık. Çalışmamızda MDA doku ve serum

örneklerinde çalışıldı, tedavi grubunda MDA düzeylerinde anlamlı düşüş olduğu görüldü.

Kahraman A. ve ark. tedavi verilen grubun İ/R grubuna göre MDA'yı anlamlı düşürdüğünü göstermişlerdir [2]. Singh D ve arkadaşları çalışmalarında 2 mg/kg ve 30 mg/kg Quercetin'i periton içine ayrı ayrı gruplarda vermişler ve MDA düzeyinin her iki grupta da kontrol grubuna göre düştüğünü, diğer enzim aktivitelerinin ise arttığını rapor etmişlerdir. 100 mg/kg oral olarak verilen Quercetin'in tedavide etkili olmadığını belirtmişlerdir [123].

Tokyo C ve ark. sıçanlarda karaciğer iskemi reperfüzyonu modeline Quercetin ve desferroksaminle yaptıkları çalışmada ilaçların ayrı olarak ve birlikte verildiğinde karaciğer İ/R grubuna göre ilaç gruplarının lipid yıkımını azalttığını histopatolojik olarak da iyileşme sağladığını göstermişlerdir [124].

Yapılan literature taramasında Quercetin'in tek dozla ve 50mg/kg olarak verildiği görüldü. Bizim çalışmamızda tedavi grubu, 3 grupta ele alındı. Quercetin 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg ayrı ayrı 3 gruba verildi ve MDA düzeylerinin artan dozlarda daha da düştüğü görüldü. Histopatolojik incelemede ise 25 mg/kg Quercetin verilen grupta iyileşmenin tam olmadığı, fakat 50 mg/kg Quercetin verilen grupta iyileşmenin tam olduğu görüldü Buna karşın 100 mg/kg Quercetin verilen grupta iyileşmenin azaldığı gözlemlendi.

Yapılan pek çok in vivo ve in vitro çalışmada α -LA'nın lipid peroksidasyon düzeylerini azalttığı ortaya konulmuştur. Birbirine paralel olarak yapılan iki ayrı çalışmada α -LA'nın, adriamisin ile sıçanlarda oluşturulan nefrotoksisite ve kardiyotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği ve artmış lipid peroksidasyonunu önemli düzeyde azalttığı belirtilmiştir [125].

Arivazhagan ve ark. tarafından yapılan üç ayrı deneysel sıçan çalışmasında ise yaşlanma ile artan lipid peroksidasyon düzeyleri farklı organlarda değerlendirilmiş; lipoik asidin plazma, karaciğer, böbrek ve farklı beyin bölgelerinde MDA düzeylerini azalttığı, lipid peroksidasyon ve protein oksidasyonunu önlediği ortaya konulmuştur [126]. Bizim çalışmamızda Quercetin verilen 25 mg/kg, 100 mg/kg grupta MDA düzeylerinin azaldığı görülmüş olup istatistiksel açıdan baktığımızda anlamlı düşüş olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

Moini ve ark. α -LA ve DHLA'nın antioksidan ve prooksidan etkilerini bir yayında derlemişlerdir. Buna göre çeşitli deneysel modellerin kullanıldığı birçok çalışma; α -LA takviyesinin in vivoda çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar altında oksidatif stresi azalttığına ve diğer antioksidanların seviyesini iyileştirdiğine dair kanıtlar ortaya koymaktadır [127].

Çalışmamızda Quercetin verilen grupta MDA düzeyinin İ/R grubuna göre düşmüş olması daha önceki çalışmalarla uyum göstermektedir. Bu MDA değerlerinin düşmesi Quercetin'in antioksidan özelliğini göstermektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada Quercetin'in AST, ALT düzeyleri üzerine anlamlı düşüşe neden olduğu görüldü ($p < 0.05$), fakat katalaz düzeyleri Quercetin verilen grupta azalmış olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlılık görülmedi ($p > 0.05$). Bunun nedeni grup sayısının az olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüş olup daha geniş kapsamlı araştırmaya gerek duyulmaktadır.

Çalışmamızda Quercetin'in MDA doku ve serum örneklerinde çalışılan düzeylerinde anlamlı düşüşe neden olduğu görüldü. ($p < 0.05$) MDA düzeyini azaltıcı etkisini gösterecek daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda histopatolojik incelemelerde 25 mg/kg ve 50 mg/kg verilen quercetinde iyileşmenin görüldüğü fakat 100 mg/kg quercetin verilen grupta iyileşmenin yanında hasarın devam ettiği görüldü. Bu sonuca neden olan Quercetin'in yüksek dozda karaciğere toksik olabileceğini düşündürmektedir.

Grup sayılarının azlığından kaynaklı bu sonuç çıkmış olabileceği gibi , bu sonuç bize daha ileri çalışmalarla farklı dozlarda yapılan ve fazla sayıda Quercetin deneyleriyle uygun doz belirlenebileceğini düşündürmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmayla Quercetin'in karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı üzerine olumlu etkileri olduğunu gösterdik. Bu bulgulardan yola çıkılarak klinikte karaciğer vasküler cerrahisi veya karaciğer nakli gibi ameliyatlarda, ameliyat öncesi Quercetin kullanımı ile ameliyat sırasında gelişebilen iskemi-reperfüzyon hasarından korumada etkili olabileceği sonucuna varılabilir..

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızda karaciğer İ/R oluşturulan ratlarda gelişen oksidatif strese bağlı gelişen karaciğer hasarında Quercetin'in etkisini araştırdık. Bu amaçla, biyokimyasal parametre olarak AST, ALT, MDA (doku ve serum) düzeyi ölçüp, karaciğer kesitlerinden histopatolojik değerlendirme yaptık.

Sonuç olarak;

- 1) İ/R + 25 mg/kg Q, İ/R + 50 mg/kg Q, İ/R 100 mg/kg Q gruplarında AST değerleri İ/R grubuna göre düşük izlenmiş olup, istatistiksel açıdan baktığımızda İ/R + 25 mg/kg Q ve İ/R + 100 mg/kg Q grubunda anlamlı düşüş olduğu görüldü.($p<0.05$)
- 2) İ/R + 50 mg/kg Q grubunda AST değeri azalmış olarak saptanmasına karşın istatistiksel açıdan anlamlılık görülmedi.($p>0.05$)
- 3) İ/R + 25 mg/kg Q, İ/R + 50 mg/kg Q, İ/R 100 mg/kg Q gruplarında ALT değerleri İ/R grubuna göre düşük izlenmiş olup, istatistiksel açıdan baktığımızda İ/R + 100 mg/kg Q grubunda anlamlı düşüş olduğu görüldü.($p<0.05$)
- 4) İ/R + 25 mg/kg Q ve İ/R + 50 mg/kg Q grubunda AST değerleri düşük izlenmesine rağmen istatistiksel açıdan anlamlılık görülmedi. ($p>0.05$)
- 5) İ/R + 25 mg/kg Q ve İ/R + 100 mg/kg Q gruplarında Katalaz değerleri İ/R grubuna göre azalmış izlenmesine rağmen istatistiksel açıdan baktığımızda anlamlılık görülmedi. ($p>0.05$)
- 6) İ/R + 50 mg/kg Q grubunda Katalaz düzeyinde İ/R grubuna göre azalma görülmedi.
- 7) İ/R + 25 mg/kg Q, İ/R + 50 mg/kg Q, İ/R 100 mg/kg Q gruplarında MDA (doku) düzeyleri İ/R grubuna göre düşük izlenmiş olup istatistiksel açıdan baktığımızda İ/R + 50 mg/kg Q, İ/R 100 mg/kg Q grubunda anlamlı düşüş olduğu görüldü.($p<0.05$)
- 8) İ/R + 25 mg/kg Q grubunda MDA (doku) düzeyleri İ/R grubuna göre düşük izlenmiş olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlılık görülmedi. ($p>0.05$)
- 9) İ/R + 25 mg/kg Q, İ/R + 50 mg/kg Q ve İ/R + 100 mg/kg Q gruplarında MDA (serum) değerleri İ/R grubuna göre azalmış izlenmesine rağmen olup

istatistiksel açıdan baktığımızda sadece İ/R + 25 mg/kg Q grubunda anlamlılık görüldü. ($p < 0.05$)

- 10) İ/R + 100 mg/kg Q grubunda MDA (serum) değerleri İ/R grubuna göre düşük izlenmiş olmasına rağmen istatistiksel açıdan baktığımızda anlamlılık görülmedi. ($p > 0.05$)
- 11) İ/R + 50 mg/kg Q grubunda MDA (serum) değerleri İ/R grubuna göre düşük izlenmiş olmasına rağmen istatistiksel açıdan baktığımızda anlamlılık görülmedi. ($p > 0.05$)
- 12) Histopatolojik incelemede İ/R + 50 mg/kg Q grubunda İ/R grubuna göre grubuna göre anlamlı iyileşme olduğu görüldü.
- 13) İ/R + 25 mg/kg Q grubunda İ/R grubuna göre grubuna göre histopatolojik olarak kısmi iyileşme olduğu görüldü.
- 14) İ/R + 100 mg/kg Q grubunda İ/R grubuna göre grubuna göre histopatolojik olarak kısmi iyileşmenin yanı sıra hasarın devam ettiği görüldü.
- 15) İ/R + 100 mg/kg Q grubunda İ/R grubuna göre grubuna göre histopatolojik olarak hasarın devam etmesi Quercetin'in yüksek dozda karaciğere toksik olabileceğini göstermekle birlikte bunun ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Bu çalışma iskemi reperfüzyon hasarında karaciğerde meydana gelen oksidatif hasarın Quercetin verilmesi ile biyokimyasal parametreler ve histopatolojik olarak anlamlı sonuçlar vermiştir. Quercetin'in bu amaçla klinik olarak kullanılması için ise daha geniş karşılaştırmalı ve daha uzun süreli deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Aragno, M., et al., Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. *Kidney Int*, 2003. 64(3): p. 836-43.
2. Kahraman, A., et al., Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *J Nephrol*, 2003. 16(2): p. 219-24.
3. Chatterjee, P.K., et al., Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*, 2002. 61(3): p. 862-71.
4. Nijveldt, R.J., et al., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001. 74(4): p. 418-25.
5. Elliott, A.J., et al., Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem Pharmacol*, 1992. 44(8): p. 1603-8.
6. Zimmerman, B.J. and D.N. Granger, Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*, 1992. 72(1): p. 65-83.
7. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*, 2011. 17(11): p. 1391-401.
8. Wilhelm, J., Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr*, 1990. 137: p. 1-53.
9. Sener, G., A. Sakarcan, and B.C. Yegen, Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res*, 2007. 51(11): p. 1345-52.
10. Serracino-Inglott, F., N.A. Habib, and R.T. Mathie, Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*, 2001. 181(2): p. 160-6.
11. Henderson, J.M., Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepatogastroenterology*, 1999. 46 Suppl 2: p. 1482-4.
12. Frangogiannis, N.G., Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost*, 2007. 97(5): p. 738-47.
13. Eltzschig, H.K. and C.D. Collard, Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*, 2004. 70: p. 71-86.

14. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, et al. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32: 169–173.
15. Thrane, A.S., J.D. Skehan, and P.S. Thrane, A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses*, 2007. 68(6): p. 1363-70.
16. Suzuki, M., et al., Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res*, 1991. 42(2): p. 125-38.
17. Jaeschke, H., et al., Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol*, 1993. 264(4 Pt 1): p. G801-9.
18. Collard, C.D., et al., Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol*, 1999. 36(13-14): p. 941-8.
19. Arumugam, T.V., et al., Protective effect of a human C5a receptor antagonist against hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Hepatol*, 2004. 40(6): p. 934-41.
20. Chen, X., et al., Osteogenic protein-1 induces bone formation in the presence of bacterial infection in a rat intramuscular osteoinduction model. *J Orthop Trauma*, 2004. 18(7): p. 436-42.
21. Garcia-Villalon, A.L., et al., Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol*, 2008. 48(2-3): p. 109-14.
22. Phillips, L., et al., Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg*, 2009. 22(1): p. 46-55.
23. Hamada, T., et al., Cyclooxygenase-2 deficiency enhances Th2 immune responses and impairs neutrophil recruitment in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Immunol*, 2008. 180(3): p. 1843-53.
24. Acworth IN, B.B., Reactive Oxygen Species. In: *The handbook of oxidative metabolism*. . 1997, Massachusetts ESA Inc.

25. Videla, L.A. and V. Fernandez, Biochemical aspects of cellular oxidative stress. *Arch Biol Med Exp (Santiago)*, 1988. 21(1): p. 85-92.
26. Reiter, R.J., et al., Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. 939: p. 200-15.
27. Niki, E., et al., Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr*, 1991. 53(1 Suppl): p. 201S-205S.
28. Berlett, B.S. and E.R. Stadtman, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, 1997. 272(33): p. 20313-6.
29. Marubayashi, S., et al., Protective effects of free radical scavenger and antioxidant administration on ischemic liver cell injury. *Transplant Proc*, 1987. 19(1 Pt 2): p. 1327-8.
30. Nordstrom, G., T. Seeman, and P.O. Hasselgren, Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery*, 1985. 97(6): p. 679-84.
31. Koepfel, T.A., et al., Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*, 1996. 61(9): p. 1397-402.
32. Mizoe, A., et al., Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat liver transplantation. *J Surg Res*, 1997. 73(2): p. 160-5.
33. Dulundu, E., et al., Alpha-lipoic acid protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Pharmacology*, 2007. 79(3): p. 163-70.
34. Sener, G., et al., Melatonin ameliorates oxidative organ damage induced by acute intra-abdominal compartment syndrome in rats. *J Pineal Res*, 2003. 35(3): p. 163-8.
35. Schoenberg, M.H. and H.G. Beger, Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med*, 1993. 21(9): p. 1376-86.

36. Steenvoorden, D.P. and G.M. van Henegouwen, The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B*, 1997. 41(1-2): p. 1-10.
37. Fridovich, I., Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1983. 23: p. 239-57.
38. Sun, Y., L.W. Oberley, and Y. Li, A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 1988. 34(3): p. 497-500.
39. Demir, S. and M. Inal-Erden, Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Chim Acta*, 1998. 275(2): p. 127-35.
40. Reilly, P.M., H.J. Schiller, and G.B. Bulkley, Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg*, 1991. 161(4): p. 488-503.
41. Moskaug, J.O., et al., Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev*, 2004. 125(4): p. 315-24.
42. Kuhnau, J., The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 1976. 24: p. 117-91.
43. Krishnamurty, H.G., et al., Identification of products produced by the anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by *Butyrivibrio* sp. C3. *Can J Microbiol*, 1970. 16(8): p. 759-67.
44. Mariani, C., et al., Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae). *Phytochemistry*, 2008. 69(5): p. 1220-6.
45. http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav_R03.pdf.
46. Bokkenheuser, V.D., C.H. Shackleton, and J. Winter, Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem J*, 1987. 248(3): p. 953-6.

47. Young, J.F., et al., Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr*, 1999. 69(1): p. 87-94.
48. Lesser, S., R. Cermak, and S. Wolfram, Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J Nutr*, 2004. 134(6): p. 1508-11.
49. Trzeciak, A., [Quercetin: significance in mutagenesis and carcinogenesis]. *Postepy Biochem*, 2001. 47(4): p. 299-306.
50. Kato, K., et al., Lack of promotive effect of quercetin on methylazoxymethanol acetate carcinogenesis in rats. *J Toxicol Sci*, 1984. 9(4): p. 319-25.
51. Weber, A., et al., Can grapefruit juice influence ethinylestradiol bioavailability? *Contraception*, 1996. 53(1): p. 41-7.
52. Amatori, F.M., et al., Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of cyclosporine in dogs. *Vet Rec*, 2004. 154(6): p. 180-1.
53. Hakkinen, S.H., et al., Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem*, 1999. 47(6): p. 2274-9.
54. Hilliard, J.J., et al., A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv Exp Med Biol*, 1995. 390: p. 59-69.
55. Grace, P.A., Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 1994. 81(5): p. 637-47.
56. Halliwell, B., How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp*, 1995. 61: p. 73-101.
57. Halliwell, B., Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 1994. 344(8924): p. 721-4.
58. Shoskes, D.A., Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation*, 1998. 66(2): p. 147-52.
59. Huk, I., et al., Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg*, 1998. 85(8): p. 1080-5.

60. Sanhueza, J., et al., Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia-reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1992. 78(2): p. 211-8.
61. Chang, W.S., et al., Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res*, 1993. 13(6A): p. 2165-70.
62. Friesenecker, B., et al., Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: in vivo observations in the hamster skin fold. *Int J Microcirc Clin Exp*, 1994. 14(1-2): p. 50-5.
63. Mandel, S., et al., Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, 2004. 88(6): p. 1555-69.
64. Aggarwal, B.B., Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis*, 2000. 59 Suppl 1: p. i6-16.
65. Kaneuchi, M., et al., Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. *Int J Oncol*, 2003. 22(1): p. 159-64.
66. Havsteen, B., Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 1983. 32(7): p. 1141-8.
67. Yoshimoto, T., et al., Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983. 116(2): p. 612-8.
68. Harnly, J.M., et al., Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J Agric Food Chem*, 2006. 54(26): p. 9966-77.
69. Thornhill, S.M. and A.M. Kelly, Natural treatment of perennial allergic rhinitis. *Altern Med Rev*, 2000. 5(5): p. 448-54.

70. Rigano, D., et al., Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. *Phytother Res*, 2007. 21(4): p. 395-7.
71. Kim, H.P., et al., Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1998. 58(1): p. 17-24.
72. Soobrattee, M.A., T. Bahorun, and O.I. Aruoma, Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors*, 2006. 27(1-4): p. 19-35.
73. Plakas, S.M., T.C. Lee, and R.E. Wolke, Absence of overt toxicity from feeding the flavonol, quercetin, to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Food Chem Toxicol*, 1985. 23(12): p. 1077-80.
74. Hertog, M.G., et al., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 1993. 342(8878): p. 1007-11.
75. Arai, Y., et al., Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr*, 2000. 130(9): p. 2243-50.
76. Osman, H.E., et al., Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. *J Nutr*, 1998. 128(12): p. 2307-12.
77. Costantino, L., et al., 1-Benzopyran-4-one antioxidants as aldose reductase inhibitors. *J Med Chem*, 1999. 42(11): p. 1881-93.
78. Singh, A., P.S. Naidu, and S.K. Kulkarni, Reversal of aging and chronic ethanol-induced cognitive dysfunction by quercetin a bioflavonoid. *Free Radic Res*, 2003. 37(11): p. 1245-52.
79. Hegarty, V.M., H.M. May, and K.T. Khaw, Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr*, 2000. 71(4): p. 1003-7.
80. Karaayvaz M, Öztürk HS, Elgün S, et. al. İntestinal ischemia and free radical metabolism. *T Klin J Med Sci*. 1996; 16: 437-439

81. Uz ZM. Radyasyonla oksidatif hasar oluşturulan ratlarda CoQ10 ve Quersetinin birlikte verilmesinin koruyucu etkisi. Uzmanlık tezi, Osman Gazi Ü. T. Fak. Biy. A. D. Eskişehir 2004.
82. Belkin M, LaMorte WL et al: The role of leukocytes in the pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury. *J Vasc Surg* 1989;10: 14-18,
83. Bortolotto SK, Morrison WA et al: Mast cell play a pivotal role in ischaemia reperfusion injury to skeletal muscles. *Lab Invest* 2004;84, 1103-1111,
84. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte depletion attenuatesvascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 1998; 254:H823 H827.
85. Elliott M, Kandaswami C, Theoharides TC.: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000; Vol 52(4), 673-751.
86. Çetin C,Köse AA, Aral E: Protective effect of fucoidin (a neutrophil Rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg* 2001;47:540-546.
87. Petrsek PF, Liauw S, et al: Salvage of postiskemik skeletal muscle by monoclonal antibody blockade of neutrophil adhesion molecule CD 18. *J Surg Res* 1994;56: 5-12,
88. De Greef KE et al: Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J. Nephrol.* 1998, 11: 110-122.
89. Tredger JM. Ischemia-reperfusion injury of the liver: Treatment in theory and practice. *Biofactors* 1998;8 (1-2) :161-164
90. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2003; 18:891–902

91. Nina E. Saxton, Johanna L. Barclay, Andrew D. Clouston, Jonathan Fawcett. Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Hepatology* 2002, 36: 241–247
92. Topaloğlu S, Abbasoglu O, Ayhan A, Sokmensuer C, Kılınç K. Antiapoptotic and protective effects of roscovitine on ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Liver International* 2003, 23: 300–307
93. Hasselgren P. O.: Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet* 1987, 164: 187-196.
94. Jaeschke H.: Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem. Biol. Interact.*, 79: 115-136, 1991.
95. Jaeschke H., Smith C. W., Mitchell J. R.: Reactive oxygen species during ischemiareflow injury in isolated perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, 81: 1240-1245, 1988.
96. Jaeschke H., Farhood A.: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am. J. Physiol.*, 260: G355-G362, 1991.
97. Dawson T. L., Gores G. J., Nieminen A. L., Herman B., Lesmasters J. J.: Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, 264: C961-C967, 1993.
98. Lefer DJ, Scalia R, et al: Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest* 1997; 4: 684-691.
99. Nijveldt R.J, Nood E, Hoorn D.E.C, Boelens P.G, Noreen K, Leeuwen P.A.M: Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Clin. Nutr.* 2001, 74: 418-425.
100. Sahna E, Deniz E, Aksulu HE. Myocardial ischemia-reperfusion injury and melatonin. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006;6(2):163–8.

101. Rhodens RS, DePalma RG. Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet.* 1980;150(3):347-52.
102. Chervu A, Moore WS, Homsher E, Quinones-Baldrich WJ. Differential recovery of skeletal muscle and peripheral nerve function after ischemia and reperfusion. *J Surg Res.* 1987;47(1):12-9.
103. Korosec P, Jezernik K. Early cellular and ultrastructural response of the Mouse liver to ischemia. *Virchows Arch.* 2000;436(4): 377–83.
104. Baykara B, Tekmen I. Karaciğer İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2005, 3:185–194
105. Crockett Elahé T , Galligan James J , Uhal Bruce D, Harkema Jack et al. Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists. *BMC Clinical Pathology* 2006, 6:3:1-13
106. Inglott S.Ferdinand , Virlos T Ioannis , Habib A Nagy, Williamson CN Robin et al. Adenosine preconditioning attenuates hepatic reperfusion injury in the rat by preventing the down-regulation of endothelial nitric oxide synthase *BMC Gastroenterology* 2002, 2; 22:1-6
107. Peralta Carmen, Bartrons Ram'On, Serafin Anna, Bl'Azquez Cristina, et al. Adenosine Monophosphate–Activated Protein Kinase Mediates the Protective Effects of Ischemic Preconditioning on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat. *Hepatology.* 2001, 34 (6):1164-1173
108. Basay S, Adsan Ö, İnal G, et. al. Verapamil ve alfa-tokoferolün rat böbreğindeki deneysel reperfüzyon hasarı üzerine karşılaştırılmalı etkileri. *Türk Üroloji Dergisi* 2003; 29 (1): 11–15
109. Arıcı M. Kas Flepleri iskemi reperfüzyon hasarında quercetin'in etkileri. Uzmanlık tezi, Osman Gazi Ü. T. Fak. Plastik C. Eskisehir, 2006.
110. Yabe Y., Kobayashi N., Nishihashi T., Takahashi R., Nishikawa M., Takakura Y., Hashida M.: Prevention of neutrofil-mediated hepatic ischemia-reperfusion injury by Superoxide dismutase and Catalase derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298: 894-899, 2001.

111. Nijveldt R.J, Nood E, Hoorn D.E.C, Boelens P.G, Noreen K, Leeuwen P.A.M: Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. Clin. Nutr. 2001, 74: 418-425.
112. Elliott M, Kandaswami C, Theoharides TC.: The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews. 2000; Vol 52(4), 673-751.
113. Grace PA : Ischaemia – reperfusion injury .Br J Surg 1994 ;81 : 637-47
114. Morin D, Hauet T, et al: Mitochondria as target for antiischemic drugs. Advanced Drug Delivery Reviews 49 (2001) ;151-174
115. Seven A, Candan G: Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. Klinik Gelisim, 1995; 8: 3906-3911.
116. Uysal M: Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen kosullar. Klinik Gelisim, 1998;11: 336-341.
117. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S: The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Rad. Bio!. Med.1994; 16: 845-850.
118. Schroeter H, Spencer J.P.E, Rice-Evans C: Current status of the potential role of flavonoids in neuroprotection. Critical reviews of oxidative stress and aging: advances in basic science, diagnostics and intervention, *ed.by* Cutler R.G., Rodriguez H., Vol. I, World Scientific Publishing, Singapore, 2003, p.137.
119. Peterson J, Dwyer J: Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. Nutr. Res. 1998, 18: 1995-2018.
120. Burak M, Çimen Y: Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. T. Klin. Tıp Bilimleri, 1999; 19: 296-304.
121. Priya S.D, Shyamala Devi C.S: Protective effect of quercetin in cisplatininduced cell injury in the rat kidney. Indian J. Pharmacol.1999, 31: 422-426.

122. Nakagawa K, Kawagoe M, Yoshimura M, Arata H, Minamikawa T, Nakamura M.: Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generator in hepatic lysosomal fractions of mice. *J. Health Science*, 2000 ; 46: 509-512.
123. Singh D, Chander V, Chopra K. The effect of quercetin, a bioflavonoid on ischemia/reperfusion induced renal injury in rats. *Arch Med Res*. 2008; 39(7): 714.
124. Tokyol C, Yilmaz S, Kahraman A, et. al. The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats. *Acta Chir Belg*. 2006; 106(1): 68- 72.
125. Bulmus GF. Kronik hiperhomosisteinemi olusturulan ratlarda alfa-lipoik asidin plazma ve çeşitli dokularda oksidan antioksidan sistem üzerine etkilerinin araştırılması Doktora Tezi, Fırat Ü. Biy. A. D. Elazığ. 2006.
126. Arivazhagan P, Panneerselyam SR, Panneerselyam C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and lipids in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003; 58: 788–791.
127. Pannala AS, Rice-Evans C. In: *Flavonoids and Other Polyphenols (Methods in Enzymology Vol. 335)*; Packer L. Ed. Academic Press, San Diego. 2001; 266–72.

