



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL
İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
QUERCİTRİN'İN ETKİLERİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Filiz YILDIZ

KAYSERİ – 2015



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL
İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE
QUERCİTRİN'İN ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Filiz YILDIZ

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma tarafından TTU-
2014-4901 proje kodu ile desteklenmiştir.**

Danışman
Prof. Dr. Engin OK

KAYSERİ – 2015

TEŞEKKÜR

Asistanlık hayatım boyunca adım adım takip ederek, hem cerrahi terbiye hem de insani terbiye anlamında kendime örnek aldığım, cerrahi bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, yanlarında olmaktan gurur duyduğum ve her zaman sevgi ve saygı ile anacağım çok değerli hocalarım Prof. Dr. Zeki YILMAZ, Prof. Dr. Erdoğan SÖZÜER, Prof. Dr. Engin OK, Prof. Dr. Alper AKCAN, Doç. Dr. Hızır AKYILDIZ, Yrd. Doç. Dr. Muhammet AKYÜZ, Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZ ve Yrd. Doç. Dr. Ertan EMEK'e;

Şu anda kliniğimizde olmayan Prof. Dr. Yücel ARITAŞ, Prof. Dr. Can KÜÇÜK ve Yrd. Doç. Dr. Tarık ARTIŞ' a;

Tez danışmanım olmayı kabul ederek bana onur veren, çalışmalarım boyunca beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Engin OK'a;

Asistanlık eğitimim boyunca çalıştığım bütün asistan arkadaşlarıma; emeklerini, desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen servis, poliklinik, yoğunbakım ve ameliyathane hemşire ve personellerine;

Deneysel aşamada desteklerini esirgemeyen DEKAM personeline

Eğitim hayatım boyunca tüm varlığıyla her daim beni destekleyen anneme, babama ve kardeşlerime;

Sonsuz teşekkürlerimle...

Dr. Filiz YILDIZ

Kayseri – 2015

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
KISALTMALAR	iii
TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ	vi
RESİMLER LİSTESİ	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ANATOMİ.....	3
2.2. SERBEST RADİKALLER	13
2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	22
2.4 QUERCİTRİN	24
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
3.1. DENEKLER.....	27
3.2. ANESTEZİ.....	27
3.3. CERRAHİ İŞLEM	28
3.4. DENEY GRUPLARI	28
3.6. DEĞERLENDİRİLECEK PARAMETRELER.....	30
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME VE BULGULAR	35
4.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	37
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR	46
KAYNAKLAR	47

KISALTMALAR

ARE	: Antioksidan cevap elementi
ATP	: Adenozin trifosfat
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
CYP	: Sitokrom P450
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dk	: Dakika
Fe	: Demir
G	: Yerçekimi kuvveti (Gravity)
gr	: Gram
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H&E	: Hemotoksilen eozin
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
İL	: İnterlökin
İMA	: İnferior mezenterik arter
ip	: İntraperitoneal
İ-R	: İskemi reperfüzyon
KAT	: Katalaz
KC	: Karaciğer

KD	: Ksantin dehidrogenaz
Kg	: Kilogram
KO	: Ksantin oksidaz
L	: Litre
LOO ⁻	: Lipit peroksi radikali
LTB ₄	: Lökotrien B ₄
MDA	: Malondialdehid
Mg	: Miligram
Mmol	: Milimol
μM	: Mikromolar
MPO	: Myeloperoksidaz
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid hidrofosfat
nmol	: Nanomol
NO	: Nitrik oksit
O ₂	: Oksijen
OH ⁻	: Hidroksil kökü
OH [•]	: Hidroksil radikali
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
[•] O ₂	: Oksijen radikali

PAF	: Platelet aktive edici faktör
PLA ₂	: Fosfolipaz A ₂
PGI ₂	: Prostaglandin (Prostoglandin I ₂)
PGE ₂	: Prostaglandin E ₂
PMNL	: Polimorfonükleer lökositler
rpm	: Dakikada tur sayısı
SMA	: Süperior mezenterik arter
SOD	: Süperoksid dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör – α
TXA ₂	: Tromboksan A ₂
ü	: Ünite
8-OHdG	: 8-hidroksi-deoksiguanozin

TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1. Serbest radikaller ve diğer reaktif O ₂ bileşikleri.	18
Tablo 2. Ohkawa ve ark. geliştirdiği metoda göre MDA tayininde kullanılan kimyasallar	32
Tablo 3. Chiu skorunun karşılaştırılması	35
Tablo 4 . GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması	37
Tablo 5. SOD değerlerinin karşılaştırılması.....	38
Tablo 6. MDA değerlerinin karşılaştırılması	38
Tablo 7 . NO değerlerinin karşılaştırılması.....	38
Tablo 8. 8-OHdG değerlerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 1. Mezenterik arteriyel dolaşım	5
Şekil 2. SMA dalları.....	5
Şekil 3. SMA ile IMA ilişkisi	6
Şekil 4. Barkow arkı.....	6
Şekil 5. Akut mezenterik iskemi kliniğinde lokal ve sistemik cevaplar	7
Şekil 6. İskemi ve reperfüzyon.....	10
Şekil 7. Quercitrin'in yapısı	26

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. İleoçekal valv ve SMA eksplorasyonu.	29
Resim 2. Süperior mezenterik arter oklüzyonu.	29
Resim 3. Süperior mezenterik arter reperfüzyonu.	30
Resim 4. Yaklaşık 3 cm’lik terminal ileum segmentinin eksizyonu.	30
Resim 5. Chiu histopatolojik hasar skorlaması evre 1.	36
Resim 6. Chiu histopatolojik hasar skorlaması evre 2.	36
Resim 7. Chiu histopatolojik hasar skorlaması evre 3.	37

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE QUERCİTRİN'İN ETKİLERİ

ÖZET

Amaç: Antioksidan özelliği bilinen Quercitrin'in deneysel intestinal İ-R modelinde reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırmak.

Materyal ve Metod: Çalışmada 30 adet Wistar–Albino sıçan kullanıldı. Sham grubu (n=10), İ-R grubu (n=10) ve Quercitrin+İ-R grubu (n=10) olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Kontrol grubundaki sıçanlar laparotomiye takiben 3 saat gözlem sonrası sakrifiye edildiler. İskemi-reperfüzyon grubuna 1 saat iskemi ve takiben 2 saat reperfüzyon uygulandı. Quercitrin+iskemi-reperfüzyon grubuna 24 saat önce gastrik lavaj ile 5 mg/kg dozunda Quercitrin verildi. Histopatolojik inceleme ve doku malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), nitrik oksit (NO) ve 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-oHDG) aktivitesi ölçümü için ileum rezeksiyonu yapıldıktan sonra sıçanlar sakrifiye edildi.

Bulgular: Histopatolojik olarak Quercitrin+İ-R ve İ-R grupları arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0.001$). Quercitrin+iskemi-reperfüzyon grubunda MDA, NO ve 8-oHDG aktivitesinde azalış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). GSH-Px ve SOD aktivitesinde İ-R göre daha fazla azalmaktadır ve sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$).

Sonuç: Quercitrin'in İ-R ile oluşan oksidatif stresi önlemiş ancak vücudun doğal oksidatif stres koruyucuları üzerinde etki yapmamıştır.

Anahtar Kelimeler: İskemi, reperfüzyon, Quercitrin, ince barsak

EFFECTS OF QUERCITRIN IN EXPERIMENTAL RAT MODEL OF INTESTINAL ISCHEMIA-REPERFUSION

ABSTRACT

Objective: To investigate effects of quercitrin known for its antioxidant features on experimental model of intestinal ischemia-reperfusion (I-R).

Material and method: Thirty Wistar-Albino rats were used in the study. Rats were assigned into 3 groups including sham group (n=30), I-R group (n=30) and quercitrin plus I-R group (n=10). In the control group, rats were sacrificed after 3-hours after laparotomy. In ischemia-reperfusion groups, rats underwent one hour of ischemia followed by 2 hours of reperfusion. In quercitrin plus reperfusion group, 5 mg/kg quercitrin was given to rats 24 hours before laparotomy by gastric lavage. Rats were sacrificed after resection of ileum for histopathological examination and measurements of tissue malonyldialdehyde (MDA), super oxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), nitric oxide (NO) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-oHDG) activities.

Results: Significant differences were detected in histopathological examination between quercitrin plus I-R and I-R groups ($p<0.001$). MDA, NO and 8-oHDG activities were significantly decreased in quercitrin plus I-R group ($p<0.001$). The extent of decrease in GSH-Px and SOD activities was greater when compared to I-R group while it was significantly greater when compared to sham group ($p<0.001$).

Conclusion: Quercitrin prevented oxidative stress induced by I-R but had no effect on native defenders against oxidative stress.

Keywords: Ischemia, reperfusion, quercitrin, small intestine

1.GİRİŞ ve AMAÇ

İntestinal iskemi, çeşitli nedenlerle ortaya çıkan, etiyolojisine göre mortalite ve morbiditesi değişen klinik bir durumdur. Strangülasyon ileusu ve akut mezenterik iskemi en sık karşılaşılan nedenlerdir [1]. Akut mezenterik iskemi hastaneye başvuruların % 1'inden daha azdır [2, 3]. Akut karın tablosundaki hastalarda ise insidansı %1 civarındadır ancak bu oran 70 yaş üstü hastalarda %10'a kadar çıkabilir [3, 4]. Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar [5]. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücrel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir[6]. Reperfüzyon ile iskemik dokuda oluşan Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)'nin, bu hasardan sorumlu olduğu ortaya konulmuş ve bazı farmakolojik ajanlar ile oluşan reperfüzyona bağlı hasarın azaltılabileceği veya önlenilebileceği yine bir dizi deneysel araştırmayla kanıtlanmıştır [7].

Literatürde Quercitrin'in antioksidan ajan olarak ince bağırsak İ-R modelinde etkisinin ve uygulama biçiminin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada,

sıçanlarda oluşturulan deneysel ince bağırsak İ-R hasarında uygulanan quercitrin'in etkisini incelemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ANATOMİ

İnce bağırsak anatomik olarak 3 bölüme ayrılır. İlk bölümü yaklaşık 25 cm uzunluğundaki duodenumdur ve ince bağırsağın en kısa, en geniş ve en az hareketli kısmıdır. Pilordan, Treitz ligamanı seviyesindeki duodenojejunal açıya kadar devam eder. İnce bağırsağın geri kalan bölümleri sırasıyla jejunum ve ileumdur. Jejunum; duodenumun bitişinden, diyafragmanın sağ krusundan başlayıp jejunumu asan duodenojejunal süspansör ligamentten (Treitz ligamanı) başlar. Ancak jejunumun biterek ileumun başladığı yer için belirgin bir anatomik ayrım mevcut değildir. İnce bağırsakların 2/5 proksimal bölümü jejunum 3/5 distal bölümü ileum olarak değerlendirilir. Terminal ileum çekumda sonlanır.

Mukozasının sirküler foldlarının (valvulae conniventes) daha geniş ve kalın olması nedeniyle jejunum duvarı daha kalındır ve çapı daha geniştir. Distale doğru valvula konnivantesler azalır, distal ileumda ise seyrekleşir ve çekum yakınında hiç bulunmaz.

İnce bağırsakların çapı ve sirküler kasların varlığı distale gidildikçe azalır. İnce bağırsakların kanlanması proksimal kısımda daha düz ve basit bir şekilde olurken (vasa recta) distal kısımda daha kompleksdir. Ayrıca jejunuma ait mezenterin iki yaprağı arasında bulunan yağ dokusu incedir, ileumda ise bu yağ dokusu daha fazladır.

Sindirim sisteminde tüm ince bağırsakları ve transvers kolonun distal 1/3'üne kadar olan kalın bağırsağı süperior mezenterik arter beslerken, bu segmentten proksimal rektuma kadar olan kısım inferior mezenterik arterden beslenir.

2.1.1. Vasküler Anatomi

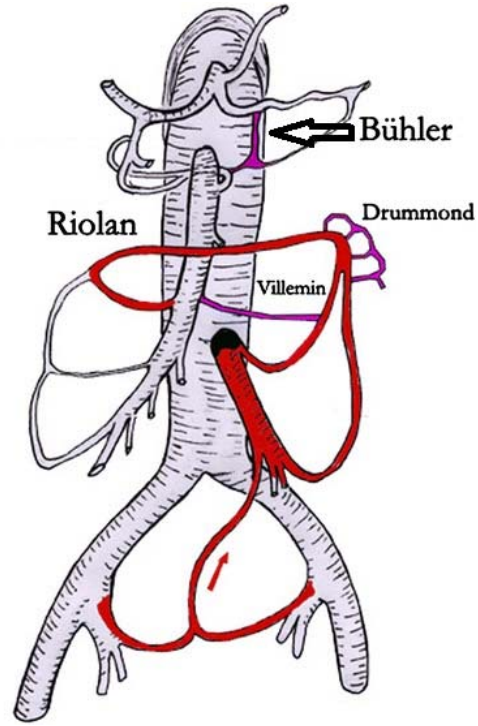
Mezenterik dolaşım üç arteri içerir:

- 1) Çölyak trunkus; mide ve duodenumun proksimal yarısını besler (Şekil 1).
- 2) Superior mezenterik arter (SMA); duodenumun distal yarısı, jejunum, ileum, çekum, çıkan kolon ve proksimal 2/3 transvers kolonu besler (Şekil 1).
- 3) Inferior mezenterik arter (IMA); 1/3 distal transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumun proksimal kısmını besler (Şekil 1). Bu dallar zengin şekilde kollateraller içerir. Bu nedenle genellikle semptomatik hastalık oluşması için en az iki ana vasküler yapıda akımın bozulması gerekir [2, 8-11].

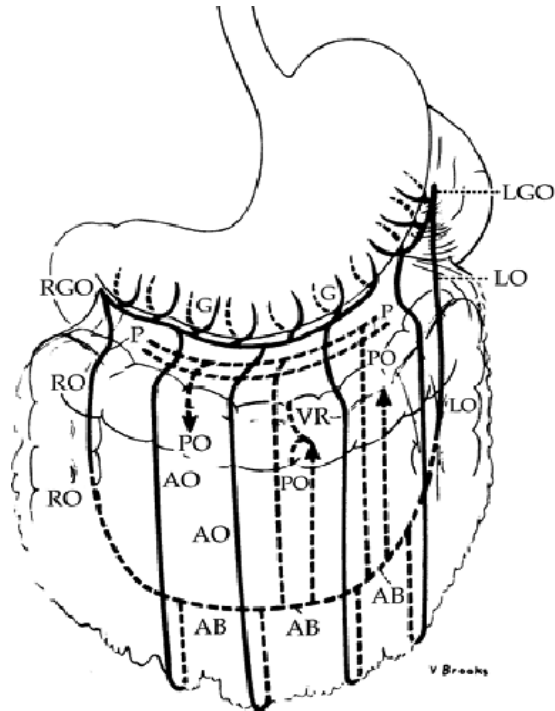
2.1.1.1. İnce Bağırsağın Arterleri

Superior mezenterik arter, çölyak arterin yaklaşık 1cm altından, L1 vertebra düzeyinde abdominal aortadan çıkar. SMA'nın en önemli dalları, inferior pankreatikoduodenal arter, 4-6 jejunal ve 9-13 ileal dal, ileokolik, sağ kolik ve orta kolik arterdir.

Jejunal ve ileal dalların hepsi SMA'dan çıktıktan sonra mezenter içinde iki uç dala ayrılır. Bu uç dallar kendilerine komşu olan diğer uç dallarla kavis biçiminde anastomozlar yaparlar. Bu kavislerin konveks taraflarından tekrar dallar çıkar. Bunlar da uç dallara ayrılarak kendi aralarında anastomozlar yaparak ikinci bir kavis meydana getirirler. Böylece iki ila beş sıra halinde anastomozlardan oluşan arter kavisleri meydana gelir. İleumda arter kavisleri daha fazla sayıda olup daha kompleks bir yapıya sahiptirler. Bağırsak mukozasında son arter kavislerinden çıkan dallar arasında kollateral dolaşım yoktur. Düz ve dik bir şekilde ilerleyerek mezenterde, jejunumda ve ileumda dağılırlar.



Şekil 3. SMA ile IMA ilişkisi [13]



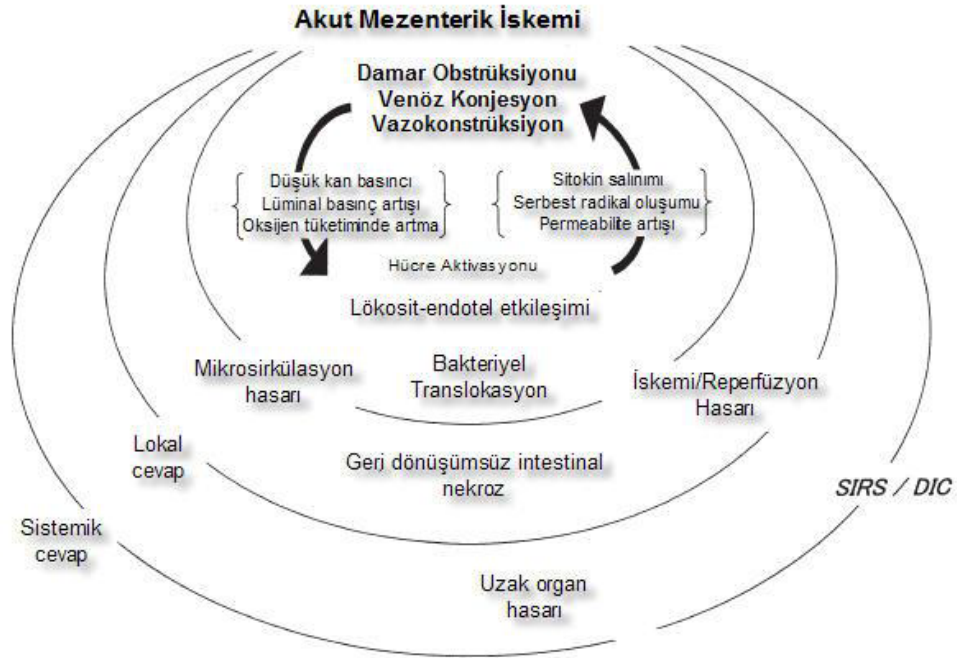
RGO: sağ gastroepiploic arter, **LGO:** sol gastroepiploic arter, **RO:** sağ omental arter, **LO:** sol omental arter, **PO:** posterior omental arter, **AO:** anterior omental arter, **AB:** Barkow arkı

Şekil 4. Barkow arkı [14]

2.1.1.4. Superior Mezenterik Arter-İnferior Mezenterik Arter Arasındaki Anatomik Bağlantılar

Süperior mezenterik arter ile IMA arasında 3 önemli bağlantı vardır. En önemlisi Drummond'un marjinal arteridir (Şekil 3). Normalde kolonun mezenterik yüzeyine yakın ve küçük olan bu arter SMA ve IMA tıkanığında genişlemektedir. İkinci önemli ilişki orta kolik arter ile sol kolik arteri birleştiren, "meandering mezenterik arter" de denilen Riolan arkıdır (Şekil 3). Normalde görüntülenmeyen bu vasküler yapı çoğunlukla visseral akımda bir tıkanmayı gösterir. Diğer bir bağlantı ise SMA ile IMA arasında embriyolojik bağlantı olan Villemin arteridir (Şekil 3).

İskemi Reperfüzyon Hasarı



Şekil 5. Akut mezenterik iskemi kliniğinde lokal ve sistemik cevaplar[15]

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre

çok daha ciddi bir hasara yol açar [5]. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir [6]. İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Dokuya gelen kan akımının kesilmesi ile hücrede oksidatif fosforilasyon azalır ve adenosin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır [16]. Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan Na^+ , K^+ -ATP az pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde Na^+ ve Ca^{++} iyon konsantrasyonları artar [17]. Hücre içinde Ca^{++} iyon konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir [18]. Nitekim yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflatuar sitokinlerin lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma olur. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar. Reperfüzyon hasarı SOR, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir [15, 19] (Şekil 5).

İskemi-reperfüzyon hasarında gerçek mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte değişik etyolojik faktörler suçlanmaktadır. Genel olarak bu faktörler; proteaz ve fosfolipaz aktivasyonu, kalsiyum konsantrasyonundaki değişiklikler, ATP tüketimi, serbest radikaller tarafından oluşturulan hücre hasarı, nitrik oksit sentezinin inhibisyonu, sitokinler ve bunlara ek olarak hücrenin immun sisteminde aktif rolü olan nötrofillerdir [20].

Reperfüzyon sonrası intestinal kapillerlerde osmotik yansıma katsayısı artar. Bu permeabilite artışı süperoksit radikallerinin spesifik gidericisi olan SOD'un uygulanımı ile büyük ölçüde önlenmiştir [21].

Bugün için intestinal İ-R hasarı oluşumunda temel 2 mekanizma ortaya atılmıştır.

Bunlar:

1. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu.

2. Fosfolipaz A2 aktivasyonu [22-24].

Bağırsakta İ-R hasarında rol oynayan SOR'un başlıca üç kaynaktan oluştuğu ileri sürülmektedir. Bunlar;

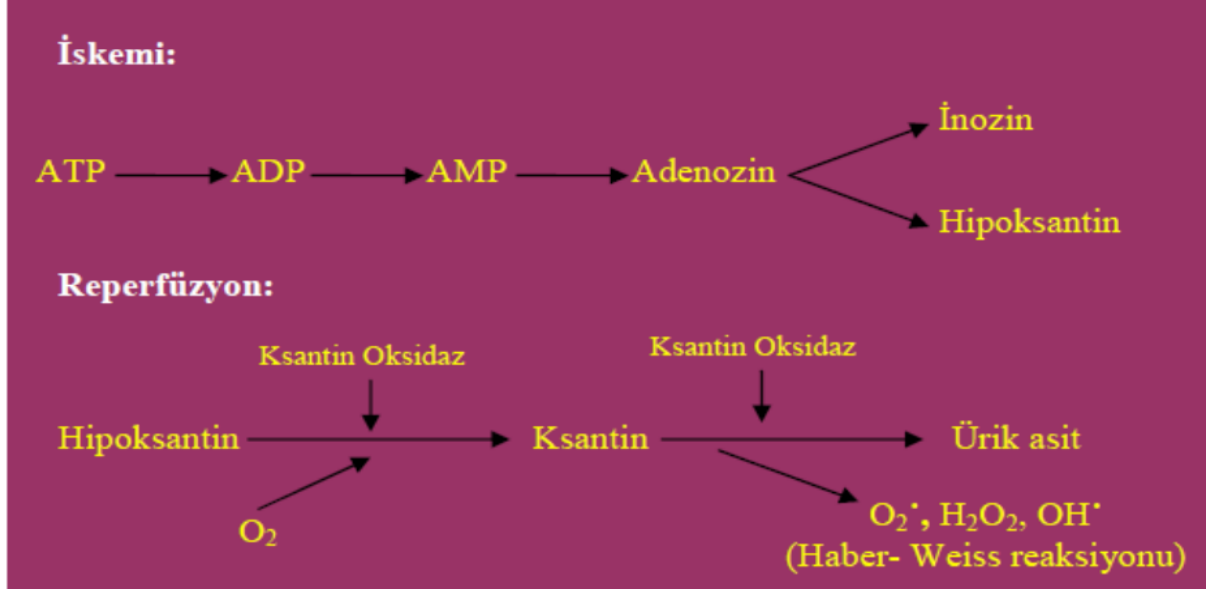
- 1) Ksantin Oksidaz (KO) reaksiyonuna bağlı serbest oksijen radikalleri oluşumu.
- 2) Nötrofillerden kaynaklanan serbest oksijen radikalleri.
- 3) Bilinmeyen sebeplerle oluşan serbest oksijen radikalleri.

1. Ksantin Oksidaz yolu

İskemi süresince hücrede ATP üretimi durur ancak tüketimi devam eder. ATP sırası ile enerjiden zengin fosfat bağları indirgenerek adenosin difosfat, adenosin monofosfat, adenosin, inozin ve hipoksantine çevrilir. Adenosin hücre dışına çıkarak inozin ve hipoksantine ayrılır. Normal dokularda hipoksantin ürik aside dönüşür. Hipoksine ise hipoksantin daha fazla metabolize edilemez ve birikir. Yapılan çalışmalarda hipoksantin düzeyi, iskemik bağırsakta normal bağırsak dokusundan 5 kat fazla bulunmuştur. Aynı zamanda iskemide ksantin dehidrogenaz (KD)'in büyük bir kısmı KO'ya dönüşür. Bu dönüşümün büyük bir bölümü iskeminin başlaması ile birlikte ilk dakikada gerçekleşir. Reperfüzyon periyodunun başlaması ve oksijenin dokulara ulaşması ile KO hipoksantini ksantine, sonra da ürik aside dönüştürür (Şekil 6). Bu basamak önemlidir çünkü bu sırada SOR oluşur. Bu reaksiyonlarda ürünler olarak ortaya çıkan H_2O_2 ve $OH^\bullet$, hücre ve mitokondri membranlarında lipidlerin peroksidasyonunu ve nötrofil infiltrasyonunu başlatma özelliğine sahiptir [25]. Serbest oksijen radikallerinin ilk oluşunu $^{\bullet}O_2$ 'dir.

Oksijen radikali, genellikle instabildir ve H_2O_2 ve O_2 'e dönüşür ancak $^{\bullet}O_2$ daha ciddi hasara neden olan oksijen radikallerinin prekürsörü olması nedeni ile de önemlidir. Hidrojen peroksit zayıf ve yavaş bir oksidandır ve katalaz enzimi etkisi ile H_2O ve O_2 'e yıkılır. Ancak reperfüzyonda H_2O_2 süperoksit radikali ile reaksiyona girerek (Haber-Weiss reaksiyonu) hidroksil kökü ($OH^\bullet$) ve hidroksil radikaline ($OH^\bullet$) dönüşür. Reperfüzyon hasarından sorumlu olan ana radikal de hidroksil radikalidir. Ancak

hidroksil radikalının oluştuğu Haber-Weiss reaksiyonunun gerçekleşmesi için ortamda metal şelatların olması gereklidir [26].



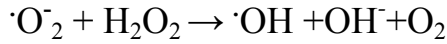
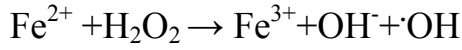
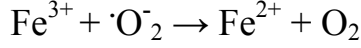
şekil 6. İskemi ve reperfüzyon [27]

Hidroksil radikali çok reaktif ve kısa ömürlü bir radikaldir. Protein, polisakkarid, nükleik asit ve ansatüre yağ asitleri gibi birçok biyolojik madde ile reaksiyona girer. Hidroksil radikallerinin karakteristik özelliği hidrojen atomlarını membrana bağlı poliansature yağ asitlerinden ayırmasıdır. Poliansature yağ asitleri hücre membranında yüksek konsantrasyonda bulunurlar ve radikaller tarafından kuşatılırlar [27]. Lipit içerikli hücre membranları bu oksijen derivativesi olan serbest radikallerin primer hedef noktasıdır. Hidroksil radikalının direkt olarak poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girmesi ile hücre membranlarında özölme ve buna bağlı hücre ölümü olur. Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden biri de malondialdehit (MDA)'dır [23-25, 27]. Son alışmalar moleküler oksijenden oluşan sitotoksik ve anstabil olan süperoksit radikalının iskemik bağırsakta kapiller permeabilite artışından sorumlu olduğunu göstermektedir [21].

Haber-Weiss Reaksiyonu

Reaktif O₂ metabolitlerinden en toksik ve en reaktif olan hidroksil radikali bu reaksiyonla oluşur. Haber- Weiss reaksiyonu demirin (Fe) katalizörlüğünde gerçekleşen

ve süperoksit radikali ile H₂O₂'nin Fe eşliğinde reaksiyona girip sonuçta hidroksil radikali, hidroksil kökü ve oksijenin oluştuğu bir reaksiyondur [28].



İskemi sırasındaki ATP katabolizmasının net sonucu hipoksantin ve ksantin konsantrasyonlarının artmasıdır. Bu reaksiyonlarla aynı anda, iskemi, KD'nin KO'a dönüşmesine neden olur. Çoğu canlıda bağırsak KO ve KD'nin ana kaynağıdır. Ksantin dehidrogenaz normal sağlıklı bireylerde bulunan predominant enzimdir ve hipoksantinin ürik aside metabolizasyonunu katalizler [22]. Bu reaksiyonda Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) elektron akseptörüdür. Doku iskemisi sırasında KD, KO'a çevrilir. Yapılan çalışmalarda bu dönüşümün iskemi sırasında bir dakika içinde gerçekleştiği gösterilmiştir [29].

Dehidrogenazın oksidaza dönüşme mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bunun proteolizis veya enzime bağlı sülfidril gruplarının disülfidlere oksidasyonu sonucu olduğu düşünülmektedir [22].

Reperfüzyon sırasında aniden O₂ konsantrasyonunun artması ve reaksiyonlara eklenmesi ile O₂ kaynaklı serbest radikallerin zincirleme reaksiyonu başlar. Bu radikaller direkt olarak hasara neden olurlar veya nötrofillerin aktivasyonu ya da lipit peroksidasyonu yolu ile hasarın etkisini arttırırlar. Ksantin dehidrogenazı içeren endotelial hücreler serbest radikallerin neden olduğu doku hasarını başlatırlar. Radikallerin neden olduğu reperfüzyon hasarında mukozaya sınırlı hasarda serbest radikaller önemli iken transmural infarktlarda herhangi bir rolleri yoktur [30].

Nötrofil Aktivasyonu

Serbest radikallerin artışı ve Fosfolipaz A₂ (PLA₂) aktivasyonu her ikisi birden intestinal dokuda nötrofillerin aktivasyonuna neden olurlar. Şiddetli mukozal lezyonların

oluşumundan da bu hücreler büyük ölçüde sorumludur [27]. Aktive olan nötrofiller fazla miktarlarda O_2 tüketimine neden olur ve hücre membranında Nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADP) katalizörlük yaptığı bir reaksiyonla aşırı miktarlarda süperoksit anyonlar oluşur. Daha sonraki reaksiyonlar SOD ve myeloperoksidaz (MPO) enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlardır. Bunların sonucunda H_2O_2 , $OH^\bullet$ ve hipoklorik asit (HCL) oluşur. Hücre membranında bulunan poliansature yağ asidi zincirleri serbest radikallere karşı son derece duyarlıdır. Sepsiste lipit peroksidasyonunun artması ile birlikte serbest radikal üretiminin arttığı ve sonuçta oksidan bir patlamanın oluştuğunu gösteren kanıtlar mevcuttur [23]. Nötrofillerde MPO enzimi kullanılarak H_2O_2 'ye klor eklenmesi ile HCL oluşur.

Myeloperoksidaz enzimi, dokularda polimorfonükleer lökositlere (PMNL) spesifik bir enzimdir ve dokulardaki lökosit düzeyinin saptanmasında yardımcıdır [31]. Myeloperoksidaz enzimi dokuda biriken polimorfonükleer lökositlerin marker enzimi olarak kullanılır ve reperfüzyon hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilir [32]. Ancak bazı çalışmalarda pyelonefritik lezyonlarda oldukça fazla miktarda nötrofil olmasına rağmen bu dokularda MPO varlığı gösterilememiştir. Bu nedenle reperfüzyon hasarında reperfüzyon yapılan organa göre bu enzimin değerleri değişebilir ve enzim değerlerindeki düşme dokudaki hasarın değerlendirilmesinde yanılgılara yol açabilir [31].

İnflamatuvar olaylara erken cevapta immün sistem; makrofaj ve nötrofil granülositleri aktive eder. Polimorfonükleer lökositler ile başlayan İ-R hasarında oluşan mukoza hasarı monoklonal antikörlerin kullanılması ile endotelial hücrelere lökosit tutunması engellenerek azaltılmıştır. Hidrojenperoksit, Fe ve süperoksitin reaksiyonları sonucu bağırsakta granülosit infiltrasyonu oluşur ve daha sonra bağırsakta reperfüzyona bağlı hücre hasarı ilerler [25]. Hücre membran hasarı sonucu hücre içine akışı kolaylaşan kalsiyum PLA_2 ve arasıdonik asit salınımını aktive eder.

Fosfolipaz A_2 ; dokudaki sitotoksik lizofosfolipitleri arttırma yeteneği olan hidrolitik bir enzimdir ve membrandaki yağ asitlerini fosfolipitlerden ayırır. Artmış fosfolipaz aktivitesi prostoglandin ve lökotrienlerin oluşumunu stimüle eder. Platelet aktive edici faktör, histamin, lizozomal enzimler, endotoksin, prostoglandin E_2 (PGE_2), Lökotrien B_4

(LTB₄) gibi metabolitlerin üretimlerinin artması ile inflamatuvar olaylar ilerler [21, 22]. Reperfüze olan bağırsakta ortaya çıkan serbest radikaller LTB₄ birikimi ve nötrofil aktivasyonuna neden olur. Böylece O₂ kaynaklı serbest radikallerin bozulmuş dağılımında ilk basamak oluşturulur ve PLA₂ aktivasyonu İ-R hasarını arttıran bir diğer faktör olarak patolojiye karışır [33].

İnce bağırsak İ-R hasarında lokal olarak üretilen serbest radikaller, araşidonik asit metabolitleri (platelet aktive edici faktör, lökotrien, prostoglandin) ve sitokinler hasarın olduğu bölgeye doğru dolaşımdaki nötrofillerin ulaşmasını kolaylaştırıp hasarı arttırırlar. Reperfüze olan bağırsakta hasarda nötrofiller ana medyatörlerdir. Bu kompleks reaksiyon nötrofillerle hasarın olduğu bölgelerdeki mikrovasküler yapıların endotelial hücreleri arasında gerçekleşir. Bu olaylardaki diğer medyatörler hasarlı bölgeye nötrofillerin adhezyon ve göçünü aktive eden adhezyon molekülleridir [34]. Ksantin oksidaz sistemi ve PLA₂ aktivasyonu, şiddetli mukozal hasardan sorumlu olduğu düşünülen nötrofillerin hasarlı olan bölgeye ulaşmalarını ve aktivasyonunu arttırarak İ-R hasarının ilerlemesine neden olur [21].

2.2. SERBEST RADİKALLER

Atomlar bir çekirdek içerirler ve elektronlar bu çekirdek etrafında genellikle çiftler halinde hareket ederler. Serbest radikal, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren herhangi bir atom veya moleküldür. Bu moleküller eşlenmemiş elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif ya da negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde bulunabilirler [35].

Süper Oksit Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller O₂'den oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikallerin biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler O₂, [•]O₂, H₂O₂, OH[•] ve geçiş metallerinin iyonlarıdır. Oksijenin elektron dağılımında iki tanesi eşlenmemiştir. Bu nedenle O₂ bazen bir diradikal olarak da değerlendirilir. Oksijenin bu özelliği onun diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girmesine neden olur [36].

Tablo 1’de hücrede oluşan serbest radikaller gösterilmiştir.

1-Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu serbest Süperoksit radikal anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$) meydana gelir. Süperoksit bir radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır [37].

2-Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur. H_2O_2 serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar [38, 39].

3-Hidroksil Radikali ($\text{OH}^{\cdot}$)

Hidroksil radikali H_2O_2 ’nin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda $\text{OH}^{\cdot}$ oluşur. Hidroksil radikali yarılanma ömrü çok kısa olan son derece reaktif bir O_2 radikalidir [40] .

4-Nitrik Oksit (NO)

1980 yılında Furchgott ve Zawadzki [41] lokal etki gösteren endotel nonprostaglandin

kaynaklı vazodilatatör varlığını göstermişler ve buna EDRF adını vermişlerdir. Ignarro ve arkadaşları [42] 1987’de EDRF adı verilen bu mediatörün NO olduğunu ileri sürmüştür. NO spesifik sitozolik bir enzim olan Nitrik Oksit Sentaz (NOS) tarafından endotel hücrelerini de içerecek şekilde birçok doku tarafından L-arginin’in L-sitrülline dönüşümü sırasında oluşan bir maddedir [43].

Şimdiye kadar üç tip NOS tanımlanmıştır:

1. Konstitüsyonel NOS (cNOS) az miktarda endotel ve nöronal NO yapımından sorumludur. Ca^{++} ve kalmoduline bağımlıdır. Uyarılma sonucu saniyeler veya dakikalar içinde düşük veya orta derecede yapılan NO, daha çok fizyolojik amaçlı olaylarda etkilidir.

2. İndüklenebilir NOS (iNOS) sitokinler ve enzimlere maruz kaldıktan sonra özellikle

Makrofajlarda NO yapımından sorumludur. Ca^{++} ve kalmoduline gereksinim göstermez. Bu enzim daha çok sitotoksik ve immünmodülatör etkilerden sorumlu, uzun sürede fazla miktarda NO yapımı ile ilişkilidir. iNOS aktivasyonu gen transkripsiyonu gerektirdiğinden, NO yapımı birkaç saat sonra görülür ancak birkaç gün devam edebilir.

3. Üçüncü tip NOS nötrofillerde bulunur. Ca^{++} bağımlıdır ancak kalmoduline gereksinim

göstermez [44]. NO bazal durumlarda vasküler endotel tarafından salınan bir maddedir [45]. Asetilkolin, ATP ve bradikinin gibi vazodilatatörler, reseptör aracılı Ca^{++} iyonunun hücreye akışını sağlayarak endotelden NO'nun üretimini ve ekstraselüler salınımını tetikler. NO, vasküler düz kas ve trombositlerde çözünebilir guanilat siklazı stimüle eder ve intraselüler siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) üretimini artırır. Artmış cGMP düzeyi, vasküler düz kasta relaksasyonu başlatır ve plateletlerin endotele agregasyon ve adezyonunu inhibe eder [46].

NO iki atom içeren, molekül ağırlığı 30 olan ve gaz yapısında bir serbest radikaldir. Küçük ve lipofilik bir moleküldür. Dayanıksız bir bileşiktir. Yarı ömrü 3-50 sn'dir [44]. Vasküler duvardaki düz kas hücre zarından basit diffüzyonla geçer. Böylece damar tonusunu lokal regülasyonunda etkin rol oynar. Daha sonra hemoglobin ve diğer hem proteinleri ile hızla reaksiyona girerek absorbe olur. Dokularda çok kısa süre kalan NO hızla stabil son ürünleri olan peroksinitrit, nitrit ve nitrata okside olur. Böylece etkisini parakrin yoldan gösterir. Hipoksi, elektriksel uyarı, kan akımındaki artış, Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi, sitokrom-C ve L-argininin fazlalığı NO'nun etkinliğini artırır [47]. Her ne kadar NO'nun mikrovasküler sistemlerde yararlı vazodilatatör etkileri varmış gibi görünüyorsa da, paradoks olarak sitotoksik radikal üretiminde yapabilir. Birçok durumda NO, süperoksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit yoluyla sekonder sitotoksik

ürünler oluşturabilir. Beckman ve arkadaşları [48] bu reaksiyon için şu biyokimyasal yolu önermişlerdir:



Peroksinitrit oluşum hızı, süperoksit ve NO düzeyleri ile ilgilidir. Süperoksit ve NO konsantrasyonunun her 10 kat artışına karşı, peroksinitrit 100 kat artabilir. Bu artış sitotoksik düzeylere çıkabilir [48]. Radi ve arkadaşları [49] peroksinitritin veya bunun ayrışma ürünlerinin demire ihtiyaç duymadan lipid peroksidasyonunu başlatabileceğini göstermişlerdir. İn vitro şartlarda endotoksinle oluşturulan hepatosit hasarında NO'nin karaciğeri koruyucu rolü olduğu ve NO'nin inhibe edilmesi ile karaciğer hasarının arttığı gösterilmiştir. iNOS inhibe edildiğinde SOR'nin, NO ve glutasyon ile inaktivasyonu ortadan kalktığı için karaciğer hasarının arttığı rapor edilmiştir. NO'nin karaciğer hastalıklarında hemodinamik cevapta hepatosit fonksiyonlarında ve hepatotoksisitede etkili olduğu saptanmıştır [50]. NO GİS'de nörotransmitter, vazorelaksan ve parankim mediatörü olarak fonksiyon görmektedir [44]. NO'ten üretilen nitrovazodilatör S-Nitrozo-N-Asetil Penisilamin (SNAP), intravenöz (İV) olarak ratlara verildiğinde bağırsak hasarına neden olan endotoksinin etkisini azaltmıştır. Bu sonuçlar endojen NO'nin hasara yol açan endotoksine karşı bağırsak mukozasını ve mikrovasküler yapıyı koruduğunu göstermektedir [50]. Endotel kökenli NO vasküler tonusun endotel tarafından kontrolünü sağlar ve endotelin kanelemanları ile etkileşimini düzenler. NO düz kas kasılmasını ve proliferasyonunu inhibe eder (antiproliferatif etki). Bu etkisini cGMP artışına yol açarak gerçekleştirir [44]. Damar lümeninde trombositlerin endotel hücrelerine adezyonunu, agregasyonunu önleyerek trombolizisi sağlar.

NO nötrofillerin agregasyonunu da inhibe eder ve nötrofillerden lizozomal enzimlerin salınımını engeller. Aktive olan nötrofillerden NO salınımı ile süperoksit anyonüretimi azalır [51]. Makrofajlarda TNF- α ve IL-1 gibi sitokinlerin aktive etmesi sonucu iNOS indüksiyonu ile oluşan NO birçok hücre dışı mikroorganizmanın ve bazen tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder ve bunlara karşı sitotoksiktir. NO'nin immünolojik olarak aktive olan lenfositlerde DNA sentezini artırdığı ve blastojenik çoğalmayı sağladığı, supresör T hücrelerini inhibe ettiği bildirilmiştir [52].

Birçok klinik çalışmada sepsis ve travma hastalarında NO'nun rolü araştırılmıştır. Sepsisli hastalarda NO'nun serum seviyesinin arttığı fakat travmaya maruz kalan hastalarda NO seviyesinin normalden az olduğu saptanmıştır [53]. Sepsisli hastalarda NO seviyesinin artışı serum endotoksin seviyesi ile doğru orantılı olarak bulunmuş ve NO'nun artışı endotoksine bağlanmıştır. Travmalı hastalarda ise NO'nun azalan seviyesinin travma sonrası gelişen hipovolemi ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda nonspesifik NOS blokajının sepsisli hastalarda kan basıncını, sistemik vasküler rezistansı ve periferik vasküler rezistansı artırdığı gösterilmiştir [54]. Endotoksemi öncesinde ya da sonrasında NOS blokajının kardiyak debiyi düşürdüğü, pulmoner hipertansiyonu ve mortaliteyi önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır. iNOS'a spesifik ajanların kullanıldığı deneylerde bu inhibitörlerin nonspesifik ajanlara göre hem dolaşım yetmezliğini hem de çoğul organ yetmezliğini ve mortaliteyi azalttığı görülmüştür [55]. Fizyolojik koşullarda NO, stabil anyonik ürünleri olan nitrit ve nitrata okside olur [56]. NO ölçümleri indirekt ve direkt yöntemler olmak üzere iki şekilde yapılabilir:

1- İndirekt yöntemler biyolojik örneklerde guanil siklaz ve NOS aktivitesinin bioassay yöntemiyle incelenmesi veya düz kas gevşetici etki, trombosit agregasyonu üzerine inhibitör etkinin ölçülmesi gibi yöntemleri içerir. L arginin, cGMP ve L-sitrülin gibi L-arginin-NO-cGMP kaskatında rolü olan maddelerin düzeylerinin ölçülmesi ile de NO hakkında indirekt bilgi edinilebilmektedir [57, 58].

2- NO düzeyinin tayininde kullanılan direkt yöntemler ise genellikle spektroskopik ve elektroanalitiktir. Bu yöntemlerden başka fluorimetri, gaz ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi yöntemler de kullanılmaktadır[59, 60]. NO düzeyi tayininde en çok kullanılan yöntem olan diazotizasyon yöntemi, hemen her biyolojik örnekte nitrit ölçümü için kullanılabilir standart bir spektroskopik yöntemdir. Bu yöntem ilk olarak 1879'da Griess tarafından tanımlanmıştır. Griess reaksiyonu nitritin asidik bir ortamda primer bir aromatikaminle (sulfanilamid) diazotizasyonu ve N-(1-naftil) etilen diamin (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması esasına dayanır [61]. Sonuçta oluşan

bileşik, 545-555 nm dalga boyundaki ışığı absorbe edebilen mor bir azo boyasıdır. Diazotizasyon yöntemi nitrit iyonlarına duyarlı olduğundan ortamdaki nitratın çeşitli indirgeme yöntemleriyle nitrite indirgenmesi gerekmektedir. İndirgeme için kullanılan yöntemler örneklerin bakırla kaplı kadmiyum kolonlarından geçirilmesi veya uygun partikül büyüklüğündeki kadmiyum tozlarıyla muamele edilmesi ve bakteriyel nitrat redüktaz enziminin kullanılmasıdır [61, 62]. Bazı araştırmacılar serum, plazma veya idrar örneklerinin deproteinize edilmesini önermektedirler. Deproteinizasyon için kullanılan yöntemler ultrafiltrasyon, $ZnSO_4$, kadmiyum veya çeşitli asitlerle muamele ve Somogyi ayırıcının kullanılması içerir [62].

Tablo 1. Serbest radikaller ve diğer reaktif O_2 bileşikleri [63].

Serbest radikaller	Radikal olmayan reaktif O_2 bileşikleri	SOR etkisi sonucu oluşan radikaller
Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Karbon merkezli radikaller ($R^{\cdot}$)
Hidroksil ($OH^{\cdot}$)	Singlet oksijen (1O_2)	Peroksil/Karboksil ($ROO^{\cdot}$)
Hidroperoksil ($HO_2^{\cdot}$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)	Alkoksil ($RO^{\cdot}$)
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	Peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)	Thiyl radikaller ($RS^{\cdot}$)
Azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$)	Ozon (O_3)	
	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)	

Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, deoksiniükleik asit (DNA), karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklere etki ederler.

1-Membran lipidlerine etkileri (Lipit peroksidasyonu)

Biyolojik moleküllerin hepsi serbest radikaller tarafından etkilenirler fakat lipidler serbest radikal hasarından en fazla etkilenen biyomoleküllerdir. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin ve kolesterolün oksidatif hasarlanmasına lipid peroksidasyonu denilmektedir. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

Lipit peroksidasyonu üç basamakta meydana gelmektedir. Birinci basamakta; çoklu doymamış yağ asitlerinin metil grubuna serbest radikal saldırısı ile lipit molekülündeki alkilik hidrojen kopartılır ve eş zamanlı alkil radikali oluşur. Alkil radikali O_2 ile tepkimeye girerek lipit peroksidasyonunu başlatabilen $OH^\bullet$ oluşturur. İkinci aşamada; radikal membran lipitlerinin moleküler O_2 ile reaksiyona girmesi ile lipit peroksit radikalleri oluşur. Lipit peroksit radikalleri de hücre membranının da bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerini sağlamakta ve kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine dönüşmektedir. Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu ürünlerden biri olan MDA proteinlerin amino grubuna, fosfolipitlere veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. Sonuçta zincirler arası reaksiyon durmakta ve radikal olmayan ürün oluşmaktadır [64]. Malondialdehit, yağ asidi oksidasyonunun özgün ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipit peroksidasyonunun derecesiyle benzerlik gösterir [65].

Malondialdehid (MDA)

Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehid (MDA) oluşur. Yağ asidi peroksidasyonu MDA'nın asıl kaynağını oluşturmakla birlikte hemoglobin (Hb) ve myoglobinin H_2O_2 ile etkileşmesi ile de oluşum gerçekleşebilir [66]. Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışına ve sonuçta hücrenin hasarına ve hücre içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Peroksidasyon sonucu oluşan MDA membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına neden olur. Bu durum hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini ve iyon transportunu etkileyebilir. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olduğundan lipid peroksidasyonunu ve serbest oksijen radikali oluşumunu MDA'yı ölçerek izlemek mümkündür [67].

2-Proteinlere etkileri

Serbest radikallerin çift bağ ve tiyol içeren moleküllerle reaktivitesinin yüksek olmasından dolayı triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein aminoasitleri serbest radikal hasarına duyarlıdır. Yapısında veya katalitik aktivitesinde

bu aminoasitler yer alan enzimler radikal etkisi ile inhibe olurlar. Ayrıca radikal etkisi ile sitoplazmik ve membran proteinlerinde çapraz bağlanmalar ve agregat oluşumu görülür. Normalde modifikasyonlara dirençli olan prolin, lizin gibi aminoasitler, O_2 , H_2O_2 , $OH^\bullet$ etkisi ile nonenzimatik olarak hidroksilasyona uğrayabilirler [68].

3-Karbonhidratlara etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitler, DNA, ribonükleik asit ve proteinlere bağlanabilir ve çapraz bağ oluşturabilirler. Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hyalüronik asitin serbest radikallerle etkileşerek bağ dokusunun durağanlığının bozulmasına ve sıvının akışkanlığının kaybına neden olur [68].

4-Nükleik asitler ve DNA'ya etkileri

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde eksojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler “DNA hasarı” olarak adlandırılır [69]. DNA hasarına neden olan etkenler endojen (yanlış eşleşmeler, insersiyon ve delesyonlar, deaminasyon ve metilasyon gibi kimyasal değişiklikler, depurinasyon/ depirimidinasyon gibi baz kayıpları, replikasyon hataları ve oksidatif hasar) ve eksojen (aflotoksin, benzopren kemoterapi ilaçları, alkileyici ajanlar, vinil klorid, mustard gazları gibi kimyasal ajanlar ve ultraviyole radyasyon, iyonize radyasyon gibi fiziksel ajanlar) olarak iki grupta değerlendirilebilir [69]. Oksidatif hasar ile baz ve şeker modifikasyonları, kovalent çapraz bağlanmalar, tek ve çift zincir kırıkları gibi çok sayıda DNA hasar ürünü oluşur [70]. Serbest radikallerin DNA hasarı iki şekilde açıklanmıştır. Birincisi OH radikali oluşumuna bağlanmıştır. Biyolojik membranları kolayca geçen H_2O_2 nükleusa penetre olur ve demir ve bakır iyonları ile reaksiyona girerek hidroksil ($^\bullet OH$) radikaline dönüşür.

İhtimallerden biri, bu metal iyonlarının her zaman in vivo ortamda DNA'ya bağlanmak için hazır bulunmalarıdır. Örneğin bakır iyonlarının kromozomlarda bulunduğu ve H_2O_2 bağımlı izole DNA hasarını teşvik edici olarak çok etkili olduğu düşünülmektedir. İkinci ihtimal ise metal iyonlarının oksidatif stres sonucu hücre içinde salıverildiği ve sonrasında DNA'ya bağlandığıdır [71]. Böylece oksidatif stres hücre içinde serbest

kalsiyum (Ca^{++})'un miktarını artırır ve hücre içi serbest demir ve/veya bakır iyonları artar ve bunlar da DNA'ya bağlanıp oksidatif hasar için DNA'yı hedef haline getirirler [71]. OH radikali DNA'nın şeker parçaları ile karbon atomlarından bir $\text{H}\cdot$ atomu ayırarak tepkimeye girer [72]. Buna ilave olarak oluşan bu karbon merkezli şeker radikalleri ile çeşitli şeker ürünleri, baz-şeker radikalleri ile abazik bölgeler, zincir kırıkları ve DNA-protein çapraz bağlantıları meydana gelir [72]. OH radikali pürin ve pirimidin bazları ile de etkileşir ve bu bazlarda değişik modifikasyonların oluşmasına neden olur [72]. DNA baz lezyonları ölümcül, mutajenik veya DNA polimeraz aktivitesine bağlı olarak her iki şekilde de sonuçlanabilir [73]. Oksidatif olarak indüklenen DNA hasarlarından en sık gözlenen mutasyonlar Sitozin-Timin değişimidir [73]. Oksidatif strese bağlı DNA hasarını açıklayan ikinci yol ise hücre içinde tetiklenen, DNA'nın omurgasını parçalayan nükleaz enziminin aktivasyonuna öncülük eden bir dizi metabolik olaydır. Oksidatif stresin hücre içi Ca^{++} miktarını artırması ve Ca^{++} bağımlı endonükleaz aktivasyonu ile programlı hücre ölümüne (apoptozis) benzer bir mekanizma ile DNA parçalanır [71]. DNA'nın oksidatif hasardan korunması için demir şelatörleri ve radikal temizleyicilerinin birlikte kullanılmalarının önemli fayda sağladığı öne sürülmüştür [71].

8-Hidroksi-Deoksiguanozin; Oksidatif DNA Hasarı Belirteci

8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OHdG) DNA, protein ve lipid peroksidasyonları ile ilişkili araştırmalarda oksidatif stres belirteci olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [74]. Tüm pürin ve primidin bazları içerisinde guanin en fazla oksidasyona eğilimli olanıdır [75]. 8-OHdG, hidroksil radikali ve deoksiguanozin tortusundan meydana gelir [74]. Modifiye bir bazolan 8-OHdG, SOR'ların DNA'da yaptığı 20'den fazla oksidatif baz hasar ürününden biri olup guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikali atakları sonucu oluşur. OH radikali, guaninin 4, 5 ve 8. pozisyonlarındaki karbon atomları ile reaksiyona girer ve DNA ürün radikallerini oluşturur. OH radikalinin C-8'e katılması ile oluşan katılma ürünü radikali ($\text{C8OH}\cdot$) bir elektron ve proton kaybederek C8 hidroksiguanin (8-OHGua)'e okside olur [76]. DNA oksidasyonunun en fazla ürünü olup aynı zamanda mutajenik potansiyeline bağlı olarak en fazla çalışılan oksidasyon stres belirtecidir [74]. Guaninden tirozin trasversiyonu üretilirken 8-OHdG DNA replikasyonu sırasında adeninle çiftleşir ve bu durum bitişik bazların yanlış okunmasına

neden olabilir [74]. Pek çok kanıt üriner 8-OHdG'nin sadece hücresel oksidatif stresin bir belirteci değil aynı zamanda kanser, ateroskleroz, diabetes gibi hastalıklar için de risk faktörü olabileceğini göstermiştir [75]. 8-OHdG, pişirilmiş gıdalardaki ısıtılmış glukozda izole edilmesi ile keşfedilmiştir [77]. Kasai ve Nishiruma, mutajenler oldukça stabil olmayan yapılar oldukları için onları izole etmenin zorluğundan dolayı, karsinojenler ve mutajenlerle reaksiyona giren, özellikle guanin gibi nükleik asit bazları tarafından oluşan guanin deriveleri gibi tuzak reaktif mutajenlerin kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir [77]. Daha sonraki çalışmalarda insan organlarında, lökosit DNA'sında ve idrarda oksidatif stres, diyet, kanser sıklığı ve yaşlanma ile ilişkili olarak 8-OHdG seviyeleri analiz edilmiştir [77]. Ayrıca 8-OHdG ile erkek infertilitesi arasında da ilişki saptanmıştır [78]. Varikozel ve subklinik varikozel hastalarında spermatik kord ve bununla ilişkili periferik kandan elde edilen lökosit DNA'sında, 8-OHdG seviyeleri tespit edilmiştir [78]. 8-OHdG DNA'da OH radikali, serbest oksijen ve tek elektron oksidanlarının oluşturduğu DNA lezyonlarının en çok görülenidir [79]. 8-OHdG baz eksizyon tamiri, nükleotit eksizyon tamiri gibi major oksidatif DNA hasarı tamir ürünlerini temsil eder [79]. Genel olarak oksidatif hasarlı DNA'nın tamir edilebildiği, tamir ürünlerinin kan dolaşımına salındığı ve oradan da daha ileri düzeyde metabolize edilmeden idrara geçtiği kabul edilir [79]. Geçtiğimiz birkaç on yılda 8-OHdG genişçe çalışılmış ve oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılmıştır [79].

2.3. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Vücutta oksidan ve antioksidan savunma sistemleri bir denge halinde bulunmaktadır. Bu dengenin oksidasyon lehine dönmesi ile oksidatif hasar oluşabilir. Serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırmak için organizmada bulunan sistemler antioksidan sistemler olarak adlandırılır. Antioksidan sistemler primer, sekonder ve tersiyer olarak üç gruptur. Primer antioksidan sistemler, serbest radikal oluşumunu engelleyerek etkili olan sistemlerdir. Serbest radikalleri biyolojik önemi olan daha zararlı moleküllere dönüşmeden etkisiz hale getirirler. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, ferritin ve seruloplazmin gibi enzimler bu grupta yer alır [80].

İskemi reperfüzyon hasarlanmasını inhibe eden pek çok endojen mekanizma bulunmakla beraber, ekzojen olarak da hasarlanmayı engelleyebilen birçok ilaç tanımlanmıştır. Etki mekanizmaları farklı olan ekzojen ve endojen ajanlar şunlardır:

Antioksidan enzimler

Serbest radikalleri, biyolojik önemi olan moleküllerle etkileşmeden önce daha zararsız bileşiklere dönüştürerek veya başka moleküllerden radikal üretimini engelleyerek etkilerini gösterirler [81, 82].

a) Süperoksit dismutaz (SOD): Bu enzim süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Enzimin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder [35, 83].

b) Katalaz: Dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir [65]. Hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalar [84].

c) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik dört selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirger [35, 84].

d) Glutasyon-S-transferazlar (GST): Antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli biokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Tüm canlı hücrelerde bulunması hayati öneminin göstergesidir [35, 84].

Serbest radikal toplayıcılar: Vitamin E, vitamin C, p-karoten, ürik asit, bilirubin, albümin bu gruptandır ve sekonder antioksidanlar olarak bilinir. Bunlar serbest radikalleri yakalayarak oluşabilecek zincir reaksiyonlarını engeller [81-83].

Nötrofil inhibitörleri: PAF antagonistleri ve 5-lipooksijenaz inhibitörleri kemotaksisi inhibe ederken Transforming Growth Faktör β ise nötrofillerin endotele yapışmasını ve adenozin reseptör mekanizması yoluyla aktive nötrofillerden serbest radikal üretimini inhibe eder [85, 86].

Ekzojen antioksidanlar

a) Ksantin oksidaz inhibitörleri: Allopürinol, folik asit, tungsten, pterin aldehit.

b)NADPH oksidaz inhibitörleri: Kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflamatuvarlar, lokal anestezikler.

c) Demir redoks döngüsünün inhibitörleri: Desferroksamin, seruloplazmin.

d) Sitokinler: Tümör nekroz faktör α (TNF- α), IL-1.

e) Barbitüratlar

2.4 QUERCİTRİN

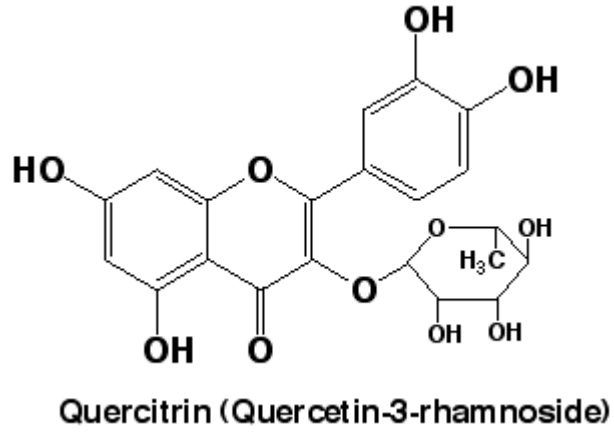
Quercitrin, doğada yaygın bulunan bir flavonoid olan Quercetin'in glikozitidir. İlk kez Avusturyalı kimyacı Heinrich Hlasiwetz (1825-1875) tarafından kimyasal analizi yapılmıştır. Doğada Quercitron (siyah meşe ağacından elde edilen sarı renkli doğal boya) boyasının yapısında ve bazı meşe türlerinde bulunur [87]. Flavonoidler en yüksek yapılı bitkilerden basit yapılı mantarlara kadar hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Flavonoidler bitki çiçeklerine renk verirler. Bitkiyi UV-B ışınlarının zararlı etkilerinden ve mikrobiyal saldırıdan korurlar. Flavonoidler fenolik yapı gösteren doğal fitokimyasallardır. Flavonoidler antioksidan aktivitelerini doğrudan radikal ürünleri yakalayıp demir, bakır gibi metalleri bağlayarak ya da ksantin oksidaz enzimini inhibe ederek gösterirler. Flavonoidlerin bir diğer etkisi enzim inhibisyonu şeklinde görülmektedir. Ayrıca araşidonik asit metabolizmasındaki enzimleri inhibe ederek ve komplement aktivasyonu azaltarak genel yangı cevabını hafifletmektedirler. Hayvan hücrelerinde sentez edilemediğinden, insanlar tarafından bitkisel besinlerin tüketimi yoluyla alınmaktadır. Birçok alt grupları olmakla birlikte yapısal farklılığına göre 6 tane temel flavonoid grubu vardır. Bunlar: Flavononlar, Flavonlar, Flavonoller, İsoflavonoidler, Antosiyaninler ve Flavanlardır.

Flavonoidlerin gösterdikleri aktivitelerin çeşitliliği çoğunlukla bu yapısal farklılıklardan kaynaklanmaktadır. En iyi tarif edilen Quercetin flavonoidlerin bir üyesidir. Quercetin, flavonol adı verilen flavonoid sınıfının bir üyesidir ve rutin, hesperidin, naringenin ve

tanperitin gibi diğer birçok flavonoidin temel omurgasını oluşturur. Quercetin'in kendisi bir aglikon veya aglukondur ve yapısında bir karbonhidrat içermez aslında rutin'in şekersiz formu olarak da adlandırılmakadır [88]. Quercitrin elma ve soğan başta olmak üzere birçok sebze ve meyvede bulunan bir Quercetin'in glikozitidir. Yapılan çalışmalarda çok kuvvetli bir süperoksit radikali tutucusu olan quercitrin in vitro ortamda lipid peroksidasyonunu engellediği ve antikarsinojenik olduğu ortaya konmuştur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda flavonoidler için, vitaminlerde olduğu gibi günlük alınması tavsiye edilen standart bir doz kesinlik kazanmamıştır [89]. Diyetimizin bir parçası olan flavonoidlerin çok çeşitli biyolojik aktiviteleri vardır. Bunlar içinde en iyi tanımlanmış olanı antioksidan aktiviteleridir. Flavonoidlerin antioksidan özelliklerinden başka özellikleri de olduğu bildirilmiştir, Bu özellikleri aşağıdaki gibi özetleyebiliriz.

- 1) Antitumor etkisi
- 2) Antiviral etkisi
- 3) Antirombotik etki
- 4) Antiinflamatuvar etki
- 5) Antiallerjik etki
- 6) Aterosklerozis ve koroner kalp hastalıklarından koruma etkisi
- 7) Vazodilatasyon etkisi
- 8) Hücrel immünitenin sitümülasyonu üzerine etkisi [90-96].

Böylesine geniş etki yelpazesine sahip olan flavonoidlerden quercitrinin üzerine son zamanlarda çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Quercitrin'in kimyasal yapısı aşağıdaki şekilde gösterilmektedir.



Şekil 7. Quercitrin'in yapısı

Bizim çalışmamızda flavanoidlerin yiyeceklerde en sık bulunan alt grubu olan quercitrinin İ-R'de antioksidan etkisini araştırıp yeni bir teropatik ajan olarak kullanıp, kullanılamayacağı değerlendirilmeye çalışılmıştır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu deneysel çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) Aralık 2013'te Etik Kurul onayı ile yapıldı (Etik Kurul Karar Tarihi: 11.12.2013, Karar No: 13/138).

3.1. DENEKLER

Çalışmada ağırlıkları 225–290 gram arasında değişen 30 adet erkek Wistar–Albino tipi sıçan kullanıldı. Gruplar randomize olarak her biri 10'ar sıçandan oluşan 3 gruba ayrıldı. Tüm sıçanlar deney gününe kadar standart laboratuvar yemi ile beslendiler ve deney öncesi tartıldılar. Sıçanlar randomize olarak sham, İ-R(kontrol) ve Quercitrin+İ-R(çalışma) gruplarına ayrıldı. Q-İ-R grubuna deneyden 24 saat önce gastrik gavaj yöntemi kullanılarak 5 mg/kg/gün dozunda quercitrin verildi[97].

3.2. ANESTEZİ

Çalışma öncesinde su içmelerine izin verilmek koşulu ile 12 saat aç bırakılan sıçanların tümünde cerrahi girişim intraperitoneal 50mg/kg ketamin (Ketalar[®], Pfizer-İstanbul) ve 10mg/kg xylazin(Rompun[®], Bayer-İstanbul) anestezisi altında yapıldı. Deney süresince spontan solunuma bırakıldı.

3.3. CERRAHİ İŞLEM

Karın cildi traş edildikten sonra povidon iyot ile temizlendi. Ksifoidden itibaren yaklaşık 6 cm'lik vertikal insizyon ile laparotomi yapıldı. İntestinal İ-R modeli için intestinal yapılar retrakte edildikten sonra SMA aortadan çıktığı yerden bulundu ve klempe edildi. Bu işlem için bulldog klempe kullanıldı. Bir saat iskemi sonrası klempe açılarak 2 saat reperfüzyon sağlandı.

3.4. DENEY GRUPLARI

Grup I. Sham grubu (n=10): Bu gruptaki deneklere yukarıda tariflendiği şekilde laparotomi yapıldıktan sonra SMA izolasyonu yapılarak 3 saat gözlem yapıldı.

Grup II. İ-R(kontrol) grubu (n=10): Bu gruptaki deneklere ise laparotomi sonrası SMA'nın klemplenmesi vasıtasıyla 1 saat iskemi ve klempe açılmasıyla birlikte 2 saat reperfüzyon yapılarak İ-R hasarı oluşturuldu [98].

Grup III. Q+İ-R(çalışma) grubu (n=10):Deneklere 24 saat öncesinde gastrik gavaj yöntemi kullanılarak 5 mg/kg/gün dozunda quercitrin verildi. 24 saati dolduran deneklere laparotomi yapıldıktan sonra SMA izolasyonu yapıp 1 saat iskemi sonrasında 2 saat reperfüzyon sağlandı [98].

Çalışma esnasında mortalite olmadı.

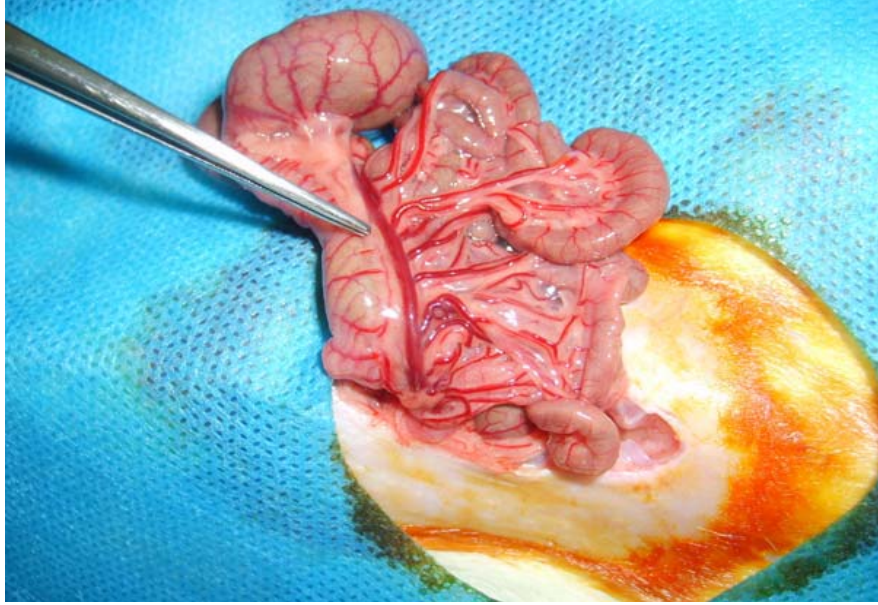
Sakrifikasyon; çalışma için örnekler alındıktan sonra abdominal aort ve vena cavaya yapılan transvers kesi ile oluşan hemoraji ile sağlandı.

3.5. DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

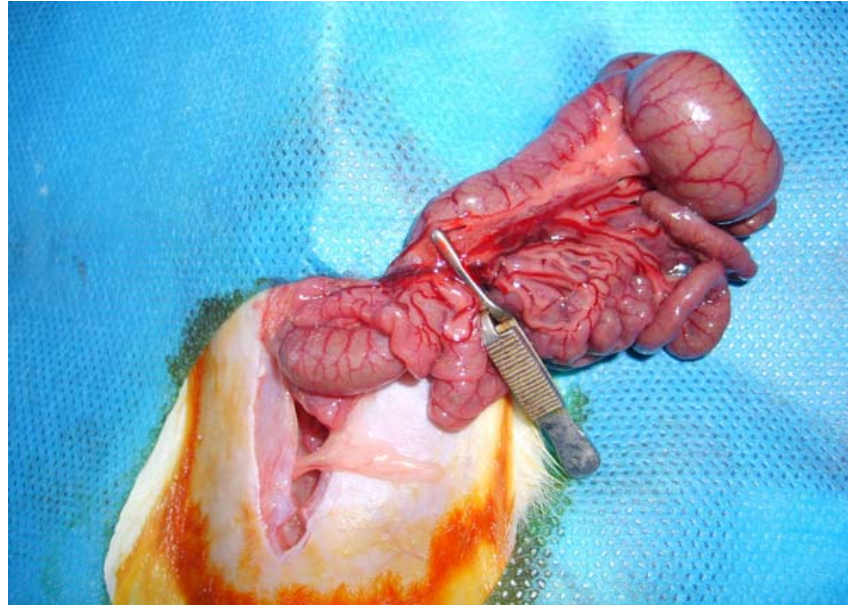
Doku örnekleme için ileoçekal valvin 10 cm proksimalindeki yaklaşık 3 cm'lik ileum segmenti rezeke edildi [99].

Alınan spesmenin 2 cm'i içerisindeki fekal içerik yıkandıktan sonra histopatolojik değerlendirme amacıyla %10'luk formaldehit içerisinde saklandı. Geri kalan 1 cm'lik kısmın içerisindeki fekal içerik de %0.9'luk salin ile yıkanıp kurutma kağıdı ile

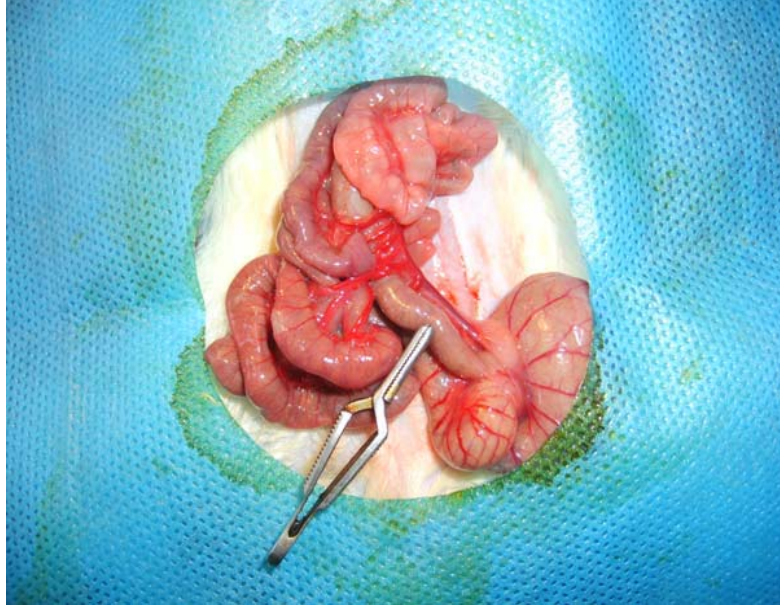
kurutulduktan sonra doku SOD, GSH-Px, NO, 8-oHdG ve MDA düzeyi tespiti için alüminyum kağıdı ile sarılarak çalışma gününe kadar -80°C’ de derin dondurucuda saklandı.



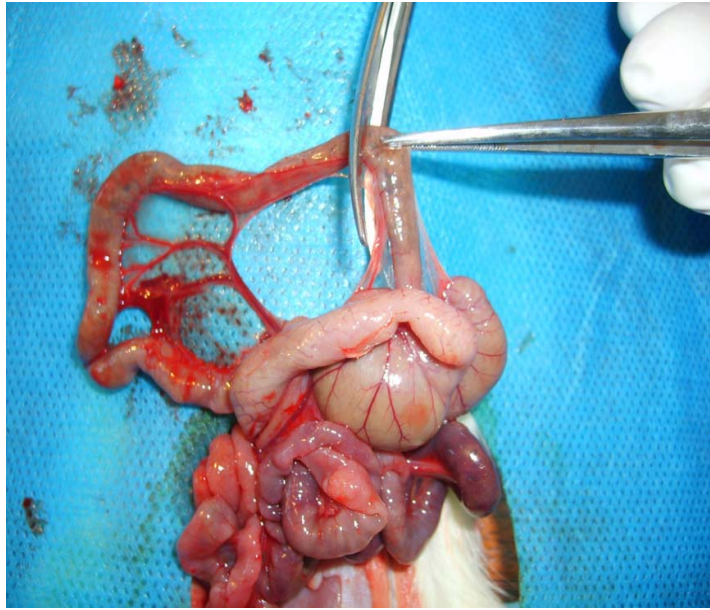
Resim 1. İleoçekal valv ve SMA eksplorasyonu.



Resim 2. Süperior mezenterik arter oklüzyonu.



Resim 3. Süperior mezenterik arter reperfüzyonu



Resim 4. Yaklaşık 3 cm'lik terminal ileum segmentinin eksizyonu.

3.6. DEĞERLENDİRİLECEK PARAMETRELER

Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Yıkanmış ve dondurulmuş doku örneklerinin her biri hassas terazi ile tartıldı ve yaş ağırlıkları gram cinsinden verildi.

Dokuların Homojenizasyonu

Yaş doku ağırlıkları tespit edilen dokular homejenizasyon tüpüne konuldu.6 ml homojenizasyon tamponu (fosfat tamponlu salin-PBS) ilave edildi. ULTRA –TURRAX T.25 basic marka homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat 10000x g’de +4 °C’ de 15 dakika santrifüj edilen berrak süpernatantlar derin dondurucuda -40 °C’ de çalışma gününe kadar saklandı. Sonuçlar miligram/protein başına verildi.

Glutasyon Peroksidaz Ölçümü

Çalışma günü çözdürülen doku süpernatantları Sunred firmasına ait Glutasyon Peroksidaz ölçüm kiti (cat.no.201-11-5104) kullanılarak ve kit prospektüsüne uyularak çalışıldı. Sonuçlar miligram protein başına verildi.

Süperoksit Dismutaz Ölçümü

Çalışma günü çözdürülen doku süpernatantları Sunred firmasına ait Süperoksit Dismutaz ölçüm kiti (cat.no.201-11-0169) kullanılarak ve kit prospektüsüne uyularak çalışıldı. Sonuçlar miligram protein başına verildi.

Nitrik Oksit Ölçümü

Çalışma günü çözdürülen doku süpernatantları Sunred firmasına ait Nitrik Oksit ölçüm kiti (cat.no.201-11-0704) kullanılarak ve kit prospektüsüne uyularak çalışıldı. Sonuçlar miligram protein başına verildi.

8-OHdG Ölçümü

Çalışma günü çözdürülen doku süpernatantları Sunred firmasına ait 8-OHdG ölçüm kiti (cat.no.201-11-0032) kullanılarak ve kit prospektüsüne uyularak çalışıldı. Sonuçlar miligram protein başına verildi

Malondialdehid Ölçümü

Lipidperoksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın ölçümünde kullanılan spektrofotometrik metodların büyük bir kısmı, MDA'nın, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek, 532 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren pembe renkli bir kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır[100]. Akciğer, karaciğer ve böbrek dokusu MDA tayininde, Ohkawa ve ark.'nın geliştirdiği metot kullanıldı [101].

Çalışma: MDA ölçümü yapılacak her numune için kullanılacak olan kimyasallar ve işlem sırası Tablo 2.'de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 2. Ohkawa ve ark. geliştirdiği metoda göre MDA tayininde kullanılan kimyasallar

Süpernatant	0.1 mL
%8.1 Sodyum dodesil sülfat	0.1 mL
%20 Asetik asit (pH3.5)	0.75 mL
%0.8 Tiyobarbitürik asit	0.75 mL
dH ₂ O	0.3 mL
95 ⁰ C sıcak su banyosunda 60 dakika kaynatıldı	
dH ₂ O	0.5 mL
n-butanol/piridin (15:1)	2.5 mL
4 ⁰ C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüje edildi	

Süpernatantlardan 0.1mL alınıp kapaklı cam tüplere konuldu. Üzerlerine sırasıyla 0.1mL sodyum dodesil sülfat (%8.1), 0.75 mL asetik asit (%20: pH 3.5), 0.75 mLtiyobarbitürik asit (%0.8) ve 0.3 mL dH₂O eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra ağızları sıkıca kapatılan tüpler, 95⁰C sıcak su banyosunda 60 dakika kaynatıldı. Kapakları açılarak soğutulan tüplere, 0.5mL dH₂O ve 2.5 mL n-butanol/piridin (15:1) karışımı eklenerekvorteksle iyice karıştırıldı. Tüplerin 4⁰C'da 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesi ile elde edilen pembe organik fazın absorbansı, 532 nm'de, distile su ile aynı şekilde çalışılan köre karşı ölçüldü. Standart eğriden elde edilen doku MDA seviyeleri (nmol/mL), aynı süpernatantlarda Bradford yöntemi ile ölçülen miligram protein başına verildi (nmol MDA/ mg protein)[102].

Histopatolojik değerlendirme

%10'luk formol içinde saklanan jejunum örnekleri histopatolojik takibe alındı. Parafin bloklara gömülen örneklerden 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen&Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Boyanan preparatlar ısı mikroskopunda değerlendirildi. Tüm histopatolojik değerlendirmelerde bakılan preparatın hangi gruba ait olduğu patolog tarafından bilinmemekteydi. İskemi-reperfüzyon hasarına bağlı ileumda oluşan histopatolojik değişiklikler Chiu ve arkadaşlarının değerlendirmesine göre yapıldı.

Tablo 2. Chiu histopatolojik hasar skorlaması [99]

Evre 0	Normal mukoza
Evre 1	Genellikle kapiller konjesyonla birlikte ve vilusların apeksinde subepitelyal Guenhagen boşluklarının oluşturulması
Evre 2	Subepitelyal alanın genişlemesi ve epitelin Lamina Propria'dan hafif derece ayrılması
Evre 3	Villusların st kısımlarında yaygın epitelyal ayrılma
Evre 4	Lamina Propria ve villuslarda dökülme, kapiller dilatasyon, Lamina Propria'da artmış selülarite
Evre 5	Lamina Propria'da sindirilme ve bütünlüğünde bozulma, kanama ve ülserasyon

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (Armonk, New York, ABD: IBM Corp.) istatistik paket programında değerlendirildi. Özet istatistik olarak birim sayısı (n), medyan, birinci ve üçüncü çeyreklik [*Medyan*(Q_1 - Q_3)] değerleri verildi. Sayısal değişkenlerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. Çoklu karşılaştırma testi olarak Student-Newman-Keuls testi kullanıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu deneysel çalışmadan elde edilen bulgular şu şekildedir.

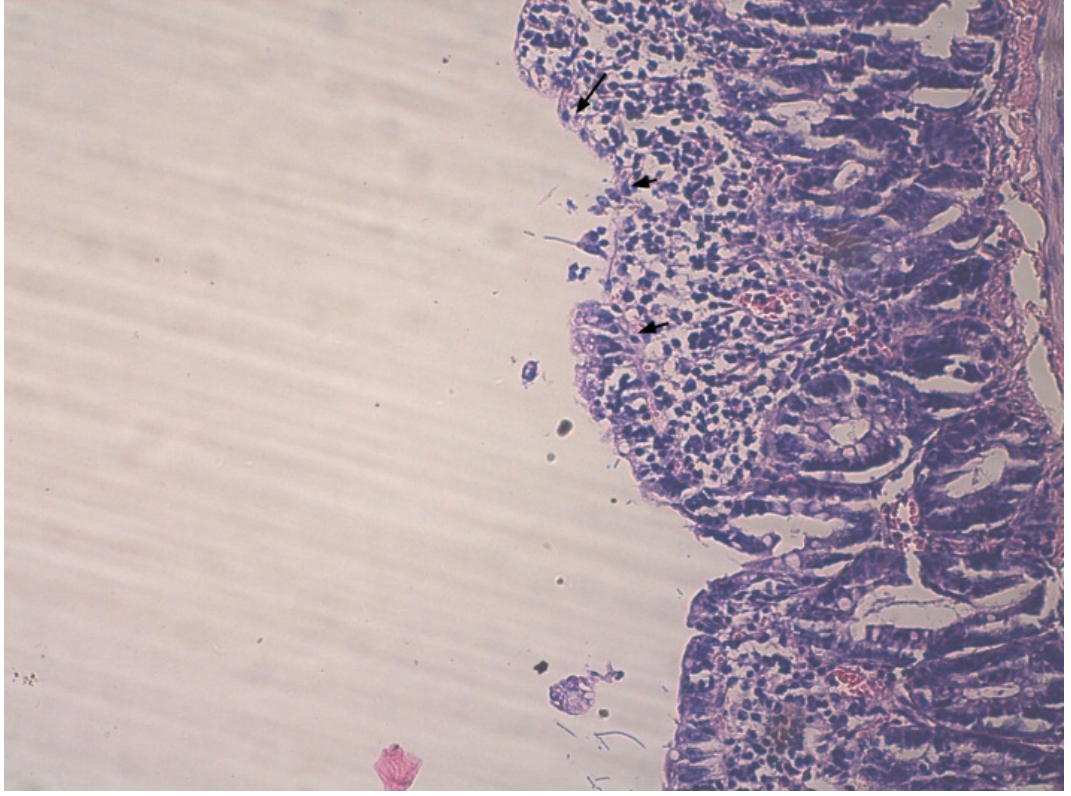
4.1. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME VE BULGULAR

Sıçanlardan elde edilen ince bağırsak dokuları histopatolojik olarak Chiu skorlamasına göre skorlandı. Çoklu karşılaştırma testine göre sham grubu ile Quercitrin+İ-R ve İ-R grupları arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0.001$).

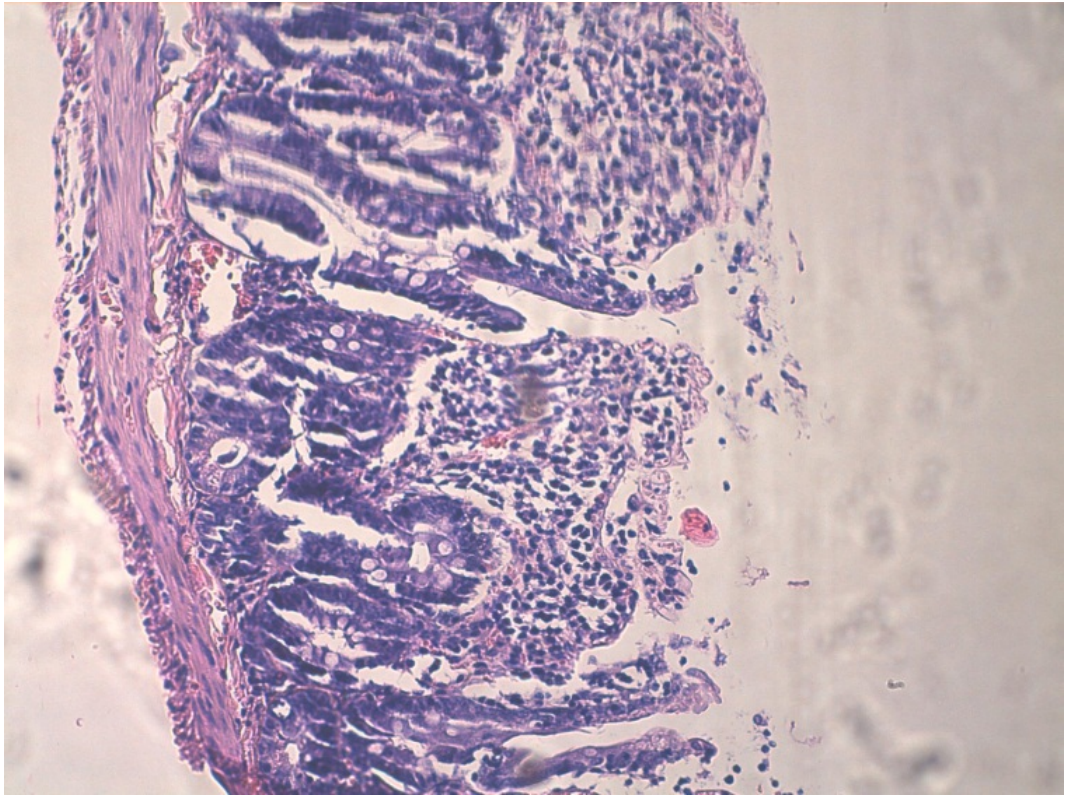
Tablo 3. Chiu skorunun karşılaştırılması

	Sham Median (min-max)	İ-R(kontrol) Median (min-max)	Quercitrin+İ-R (alışma) Median (min-max)
Chiu skoru	0,00 (0,00-0,00) ^a	3,5(3,00-4,00) ^b	3 (3,00-4,00) ^c

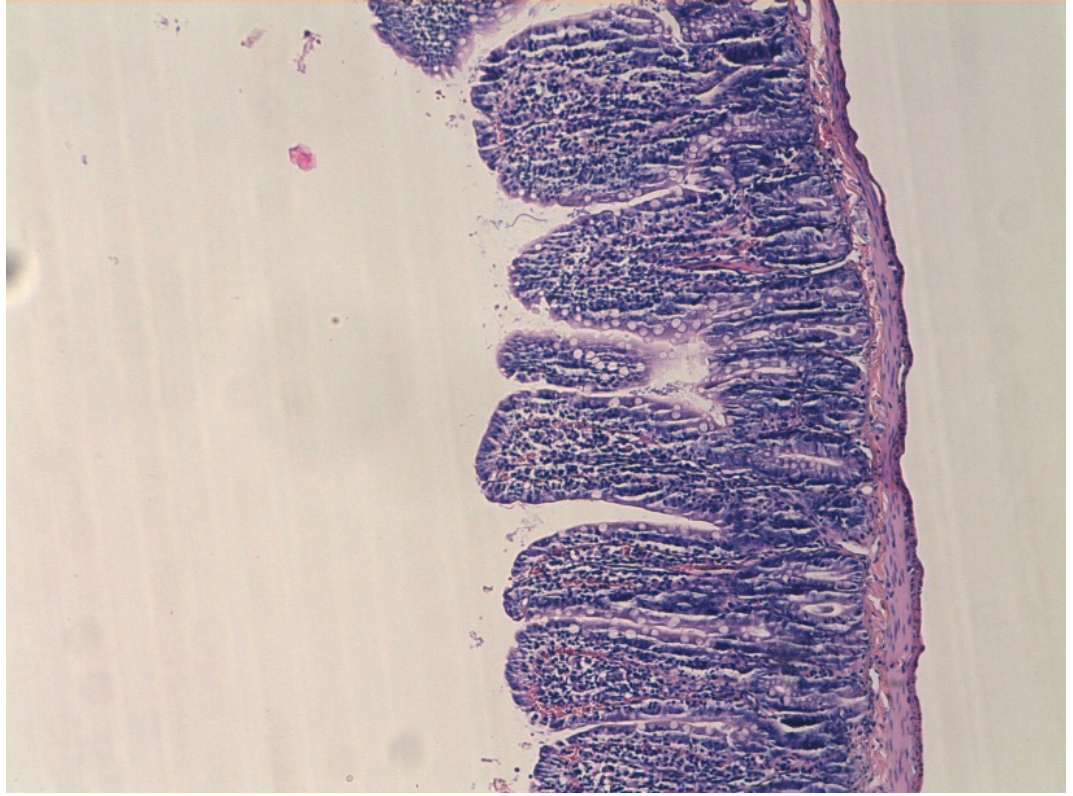
a,b,c: Gruplar arası farklılığı göstermektedir. Aynı harfin bulunduğu gruplar arasında fark yoktur.



Resim 5. Chiu histopatolojik hasar skorlaması evre 1



Resim 6. Chiu histopatolojik hasar skorlaması evre 2



Resim 7. Chiu histopatolojik hasar skorlaması evre 3

4.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Tablo 4 . GSH-Px değerlerinin karşılaştırılması

	Sham <i>Medyan(Q₁-Q₃)</i>	IR(kontrol) <i>Medyan(Q₁-Q₃)</i>	QIR(çalışma) <i>Medyan (Q₁-Q₃)</i>	p
GSH-Px (ng/mg)	7,149(5,016-10,344) ^a	3,793(3,251-5,034) ^b	1,862(1,595-2,735) ^c	<0,001

a,b,c: Gruplar arası farklılığı göstermektedir. Aynı harfin bulunduğu gruplar arasında fark yoktur.

Glutasyon peroksidaz aktivitesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında; sham grubuna göre İ-R grubu enzim aktivitesinin azaldığı; quercitrin uygulanan grubunda enzim aktivitesinin daha da azaldığı tespit edildi.

Tablo 5. SOD değerlerinin karşılaştırılması

	Sham <i>Medyan</i> (Q ₁ -Q ₃)	IR <i>Medyan</i> (Q ₁ -Q ₃)	QIR <i>Medyan</i> (Q ₁ -Q ₃)	p
SOD(ng/mg)	0,135 (0,0956-0,167) ^a	0,0704 (0,05890,0861) ^b	0,0418 (0,0369-0,0519) ^c	<0,001

a,b,c: Gruplar arası farklılığı göstermektedir. Aynı harfin bulunduğu gruplar arasında fark yoktur.

SOD aktivitesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında; sham grubuna göre İ-R grubu enzim aktivitesinin azaldığı; quercitrin uygulanan grubunda enzim aktivitesinin daha da azaldığı tespit edildi.

Tablo 6. MDA değerlerinin karşılaştırılması

	Sham <i>Medyan</i> (Q ₁ -Q ₃)	IR <i>Medyan</i> (Q ₁ -Q ₃)	QIR <i>Medyan</i> (Q ₁ -Q ₃)	p
MDA (nmol/mg protein)	0,344 (0,245-0,381) ^a	0,208 (0,176-0,233) ^b	0,175 (0,132-0,194) ^c	<0,001

a,b,c: Gruplar arası farklılığı göstermektedir. Aynı harfin bulunduğu gruplar arasında fark yoktur.

MDA düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması yapıldığında; sham grubuna göre İ-R grubu MDA değerlerinin azaldığı; quercitrin uygulanan grubunda MDA değerinin daha da azaldığı tespit edildi.

Tablo 7 . NO değerlerinin karşılaştırılması

	Sham <i>Medyan(Q₁-Q₃)</i>	IR <i>Medyan(Q₁-Q₃)</i>	QIR <i>Medyan (Q₁-Q₃)</i>	p
NO(μmol/mg)	4,315(3,663-5,459) ^a	2,342(2,138-2,852) ^b	1,405(1,112-1,806) ^c	<0,001

a,b,c: Gruplar arası farklılığı göstermektedir. Aynı harfin bulunduğu gruplar arasında fark yoktur.

NO düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması yapıldığında; sham grubuna göre İ-R grubu NO değerinin azaldığı; quercitrin uygulanan grubunda NO değerinin daha da azaldığı tespit edildi.

Tablo 8. 8-OHDG değerlerinin karşılaştırılması

	Sham <i>Medyan(Q₁-Q₃)</i>	IR <i>Medyan(Q₁-Q₃)</i>	QIR <i>Medyan (Q₁-Q₃)</i>	p
8-OHDG (ng/mg)	0,985(0,884-1,340) ^a	0,505(0,375-0,665) ^b	0,280(0,200-0,295) ^c	<0,001

a,b,c: Gruplar arası farklılığı göstermektedir. Aynı harfin bulunduğu gruplar arasında fark yoktur.

8-OHDG düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması yapıldığında; sham grubuna göre İ-R grubu 8-OHDG değeri azaldığı; quercitrin uygulanan grubunda 8-OHDG değerinin daha da azaldığı tespit edildi.

5. TARTIŞMA

İntestinal iskemide oksijen ve doku kanlanması azalır ve doku hasarı oluşur. İntestinal reperfüzyon ile doku hasarı daha da şiddetlenir [103, 104].

Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan SOR türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir [6].

İ-R hasarını açıklayan kesin bir mekanizma bulunmamakla birlikte, hasardan sorumlu birkaç mekanizmadan sözedilebilir. Sitokinler, nötrofil aktivasyonu, endotel adezyonu ve bunun sonucunda üretilen toksik metabolitler, PAF, fosfolipaz A2'nin aktivasyonu, ksantin oksidaz enzim sistemi ve serbest oksijen radikalleri en önemli hasar mekanizmalarıdır. İskemik bağırsak sistemik ve portal dolaşıma hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri, sitokinler, araşidonik asit metabolitleri gibi inflamatuvar metabolitler salgılar. Yapılan çalışmalar reperfüzyon sonrası moleküler oksijene bağlı olarak oluşan hasarın iskekiye bağlı intestinal mukoza hasarından daha şiddetli olduğunu göstermektedir [105, 106].

SOR, PMNL, kompleman sistemi, endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır.

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenmiş olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron eklenmesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir [107].

İnce bağırsakta İ-R hasarını önlemeye yönelik çalışmalar artarak devam etmektedir. Farklı hayvan çalışmalarında dokuların İ-R hasarından korunması için çeşitli tedavi yöntemleri başarıyla kullanılmıştır. Bunlar; iskemik ön koşullama, antioksidan ajanlarla tedavi, NO uygulamaları, perflorokarbonlarla tedavi, enteral beslenme, glisin ve glutamin uygulamalarıdır [108].

Sıçanlarda deneysel intestinal İ-R modelinde SMA'nın obliterasyonu vasıtasıyla iskemi ve obliterasyonun giderilmesiyle reperfüzyon oluşturma süreleri literatürde hala tartışmalı bir konudur. Mallick ve ark. deneysel modellerinde bu süreleri iskemi için 30 dk, reperfüzyon için ise 120 dk olarak uygulamışlardır [109]. Bu çalışmada deneklere ise laparotomi sonrası SMA'nın klemplenmesi vasıtasıyla 1 saat iskemi ve klempin açılmasıyla birlikte 2 saat reperfüzyon yapılarak İ-R hasarı oluşturuldu [98].

Bir flavonoid olan quercitrinin çok çeşitli biyolojik aktiviteleri vardır. Bunlar içinde en iyi tanımlanmış olanı antioksidan aktiviteleridir. Flavonoidlerin antioksidan özellikleri dışında antitümoral, antiviral, antitrombotik, antiinflamatuvar, antiallerjik, aterosklerozis ve koroner kalp hastalıklarından koruyucu, vazodilatasyon, hücrel immünitinin sitümülasyonu gibi etkileri de olduğu bildirilmiştir [90-96].

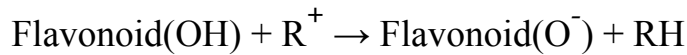
Quercitrin çeşitli çalışmalarda farklı dozlarda kullanılmıştır. Camuesco ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada DSS kullanılarak oluşturulan kolit modelinde quercitrinin iki farklı tedavi dozunda etkinliği araştırılmıştır. Quercitrin'in antiinflamatuvar etkinliğini iNOS'u inhibe ederek gösterdiği ortaya konulmuştur. Ayrıca bu çalışmada immünohistokimyasal olarak makrofajların ve granülositlerin infiltrasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Quercitrin'i 1 mg/kg/gün ve 5 mg/kg/gün dozunda kullanmışlardır. 1mg/kg/gün dozunun daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir [110].

Sánchez de Medina ve ark.'nın yaptığı bir diğer çalışma ise quercitrinin trinitrobenzensülfonik asit ile oluşturulan deneysel kolit modelinde quercitrinin

antiinflamatuvar özelliği gösterilmiştir. Bu çalışmada 1 ve 5 mg/kg/gün dozlarında quercitrinin kolitinin erken safhalarındaki (24 saat) etkisi araştırılmıştır. Flavonoidle tedavi kolonik malonaldehit artışını engellemiş nitrikoksit sentaz ve ALP aktivitesini inhibe etmiştir ancak görünürdeki hasara etkisi olmamıştır. Nötrofil infiltrasyonuna etkisi (myeloperoksidaz) gösterilememiştir. Quercitrinin trinitrobenzensülfonik asit kronik kolitindeki yararlı etkilerinin hidroelektrik transporttaki bozukluklarda düzelme ve buna bağlı olarak inflamatuvar kaskadın erken dönemde bloke edilmesine bağlı olduğu düşünülmüştür [97].

Biyolojik moleküllerin hepsi serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipitler serbest radikal hasarından en fazla etkilenen biyomoleküllerdir. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin ve kolesterolün oksidatif hasarlanmasına lipit peroksidasyonu denilmektedir. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olduğundan lipid peroksidasyonunu ve serbest oksijen radikal oluşumunu MDA'yı ölçerek izlemek mümkündür [67].

Quercetin serbest radikale bağlı hasardan korunmayı farklı yollarla yapmaktadır. Bu yollardan biri direkt radikal temizleme özelliğidir. Quercetin'in OH[•] radikalini [111, 112] ve onun prekürsörü olan O₂⁻ radikalini [113] temizlemesinin yanında önemli bir özelliği de, lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır [114]. Radikallerin flavonoidler ile aşağıdaki reaksiyonla oksidize edilmeleri onların daha stabil hale getirir ve reaktivitelerini düşürür [115, 116].



Quercetin ayrıca Fe ve Cu gibi geçiş metallerini şelatlayarak bu iyonların fenton reaksiyonu yolu ile H₂O₂'den OH[•] radikali oluşumunu engelleyerek lipid peroksidasyonunu önlemektedir [117, 118].

Flavonoidlerin lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve MDA düzeylerini anlamlı olarak düşürdükleri gösterilmiştir [115-117, 119, 120].

Kahraman A. ve ark. tedavi verilen grubun İ-R grubuna göre MDA'yı anlamlı düşürdüğünü göstermişlerdir [117].

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 oksidasyonu önlediği ortaya konulmuştur [121].

Çalışmamızda MDA düzeyinin Quercitrin verilen grupta azaldığı görülmüş olup istatistiksel açıdan baktığımızda anlamlı düşüş olduğu görülmüştür ($p<0.001$). Quercitrin verilen grupta MDA düzeyinin İ-R grubuna göre düşmüş olması daha önceki çalışmalarla uyum göstermektedir. Bu MDA değerlerinin düşmesi Quercitrin'in antioksidan özelliğini göstermektedir.

SOD süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Enzimin fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder [35, 83].

Reperfüzyon öncesi uygulanan SOD bağırsak lümenine olan net sıvı kaybını önler ve mukozal lezyonların ilerlemesini engeller [122].

Glutasyon peroksidazın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal etkisi ile fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. Glutasyon peroksidaz eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır [123].

Serbest radikallerin oluşumu ister kazara ister kasıtlı olsun çok sayıda hastalıkta önemli yer tutmaktadır ve serbest radikalleri süpürücü etkisi olduğu gösterilmiş olan Quercitrin'in bu tür hastalıklarda ve iskemi-reperfüzyona bağlı doku hasarında koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir [124] .

Çalışmamızda SOD ve GSH-Px değerleri QİR grubunda sham ve İ-R grubuna göre daha düşük olduğu görüldü. Bu da bize Quercitrin'in vücudun doğal oksidatif stres koruyucuları üzerinde etki yapmadığını gösterir.

Hipoksi, elektriksel uyarı, kan akımındaki artış, Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi, sitokrom-C ve L-arginin'in fazlalığı NO'nin etkinliğini artırır [47]. Quercetin, indüklenabilir 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 yapısal NOS tarafından salıverilmesi kan damarlarının dilatasyonunun sağlanmasında önemli olmakla birlikte iNOS tarafından makrofajlardan salıverdirilen nitrik oksidin yüksek konsantrasyonlarda bulunması oksidatif hasara yol açabilir. Bu durumda aktive olan 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 irreveribl hasara yol açar. Quercetin ise bu serbest radikalleri ortamdaki süpürdüğü için nitrik oksitle reaksiyona giremezler ve daha az hasar oluşur [125, 126].

Çalışmamızda NO düzeyinin quercitrin verilen grupta azaldığı görülmüş olup istatistiksel açıdan baktığımızda anlamlı düşüş olduğu görülmüştür ($p<0.001$).

NO değerlerinin düşmesi Quercitrin'in iskemi-reperfüzyon hasarının azalmasında etkili olduğunu göstermektedir.

Oksidatif strese bağlı DNA hasarını daha önce iki farklı mekanizma ile açıklamıştık. Birincisi OH radikali oluşumuna bağlanmış diğeri ise Ca^{++} miktarının artması ve nükleaz enziminin aktivasyonuna bağlanmıştır.

8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OHdG) DNA, protein ve lipid peroksidasyonları ile ilişkili araştırmalarda oksidatif stres belirteci olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. DNA oksidasyonunun en fazla ürünü olup aynı zamanda mutajenik potansiyeline bağlı olarak en fazla çalışılan oksidasyon lezyonudur [74]. Bizim çalışmamızda 8-OHdG'in quercitrin verilen grupta diğerlerine göre azaldığı görülmüş olup istatistiksel açıdan baktığımızda anlamlı düşüş olduğu görülmüştür ($p<0.001$). Bu durum Quercitrin'in bunu serbest radikalleri süpürücü etkisine bağlı olabilir.

İntestinal İ-R hasarının histopatolojik değerdendirilmesinde birçok skorldama sistemi geliştirilmiştir. Chiu ve ark. [74] tarafından tanımlanan histopatolojik sınıflama intestinal İ-R hasarı ve buna karşı kullanılan antioksidan ajanların etkisinin histopatolojik olarak değerdendirilebildiğı sık kullanılan, basit ve sade bir morfolojik skorldama sistemidir.

Histopatolojik hasar yönünden gruplar değerdendirildiğinde en fazla hasarın İ-R grubunda olduğı görüldü. Sham grubu ile QİR ve İ-R grupları arasındaki fark anlamlı bulundu. Quercitrin grubunda histolojik hasar diğerd İ-R grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Biyokimyasal olarak oksidatif stresi önleyen Quercitrin'in bu etkisi histopatolojik olarak da gösterilmiştir.

Antioksidan savunma mekanizmalarının bilinmesi ve ince bağırsak da oluşrdan oksidatif strese bağırlı hasarlanmanın iyi anlaşılması, klinik ortamda cerrahiye yardımcı yeni antioksidan tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi bakımından önemlidir. Cerrahi uygulamalara yardımcı olabilecek bu tür destek tedavileri İ-R'in etiyolojisinde rol aldığı hastalıkların tedavisinde kullanılması ile bu tür hastalıklarda mortalite ve morbiditeyi azaltabilmek mümkündür.

Sonuç olarak Quercitrin İ-R ile oluşrdan oksidatif stresi önlemiş ancak vücudun doğal oksidatif stres koruyucuları üzerinde etki yapmamıştır. Doğal koruyucu mekanizmaların çalışma grubunda daha düşük olması, Quercitrin'in daha az oksidatif strese neden olması ile açıklanabilir.

6. SONUÇLAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya DEKAM’da gerçekleştirilen “Sıçanlarda oluşturulan deneysel intestinal iskemi reperfüzyon modelinde Quercitrin’in etkileri” adlı çalışmanın sonuçları şu şekilde sıralanabilir:

1. Histolojik olarak Quercitrin’in iskemi sonrası reperfüzyona bağlı intestinal mukoza hasarını azaltıcı etkisi mevcuttur.
2. Bu çalışma da MDA, NO ve 8-OHdG aktivitelerinde ki azalmanın Quercitrin’in oksidatif stres üzerinde önleyici etkisini göstermektedir.
3. Quercitrin’in SOD ve GSH-Px gibi vücudun doğal antioksidanların üzerinde bir etkiye sahip değildir.

KAYNAKLAR

1. İlgi, Gastrointestinal sistem anatomisi. Temel Cerrahi (3. baskı), 2004. 1015-1024.
2. Wyers, M.C., Acute mesenteric ischemia: diagnostic approach and surgical treatment. *Semin Vasc Surg.* 23(1): p. 9-20.
3. Schoots, I.G., et al., Thrombolytic therapy for acute superior mesenteric artery occlusion. *J Vasc Interv Radiol*, 2005. 16(3): p. 317-29.
4. Dahlke, M.H., et al., Mesenteric ischemia--outcome after surgical therapy in 83 patients. *Dig Surg*, 2008. 25(3): p. 213-9.
5. Zimmerman, B.J. and D.N. Granger, Reperfusion injury. *Surg Clin North Am*, 1992. 72(1): p. 65-83.
6. Wilhelm, J., Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr*, 1990. 137: p. 1-53.
7. Mallick, I.H., et al., Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*, 2004. 49(9): p. 1359-77.
8. Bobadilla, J.L., Mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am.* 93(4): p. 925-40, ix.
9. Yasuhara, H., Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today*, 2005. 35(3): p. 185-95.
10. Klar, E., et al., Acute mesenteric ischemia: a vascular emergency. *Dtsch Arztebl Int.* 109(14): p. 249-56.
11. Sise, M.J., Acute mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am.* 94(1): p. 165-81.
12. Townsend, Sabiston Textbook of Surgery (17th ed.). Saunders Company, 2004. p.24.
13. Douard, Clinical interest of digestive arterial trunk anastomoses. *Surg Radiol Anat.* 28(3):219-27., 2006. 28(3): p. 219-27.
14. Fischer, Mastery of Surgery (5th ed.) Lippincott Williams & Wilkins, 2007: p. 821.

15. Bathe, O.F., A.W. Chow, and P.T. Phang, Splanchnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery*, 1998. 123(1): p. 79-88.
16. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*, 1991. 42: p. 225-46.
17. Green, C.J., et al., The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun*, 1989. 7(3-6): p. 255-64.
18. Orrenius, S., et al., Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol*, 1992. 32 Suppl: p. S33-42.
19. Terzi, sıçanlarda intestinal iskemi modelinde profilaktik kısa ve uzun süreli doz allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. *klınık ve deneysel cerahi dergisi*, 2000. 9: p. 10-16.
20. Bilbao, G., et al., Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg*, 1999. 230(2): p. 185-93.
21. Parks, Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 1983. 245: p. 285-289.
22. Schoenberg, M.H. and H.G. Beger, Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med*, 1993. 21(9): p. 1376-86.
23. Molnar, Z., E. Shearer, and D. Lowe, N-Acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med*, 1999. 27(6): p. 1100-4.
24. Savas, C., et al., Pentoxifylline inhibits overflow and reduces intestinal reperfusion injury. *J Pediatr Surg*, 1997. 32(6): p. 905-10.
25. Mustafa, N.A., et al., Role of diltiazem in ischemia-reperfusion injury of the intestine. *Eur Surg Res*, 1994. 26(6): p. 335-41.
26. Grace, ischaemia-reperfusion injury. *british j of surgery*, 1994. 81: p. 637-647.
27. Günel, Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *pediatr surg*, 1998. 33: p. 1536-1539.

28. 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.
29. Parks, D.A., et al., Soybean trypsin inhibitor attenuates ischemic injury to the feline small intestine. *Gastroenterology*, 1985. 89(1): p. 6-12.
30. Haglund, U. and D. Bergqvist, Intestinal ischemia -- the basics. *Langenbecks Arch Surg*, 1999. 384(3): p. 233-8.
31. Ormrod, D.J., G.L. Harrison, and T.E. Miller, Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J Pharmacol Methods*, 1987. 18(2): p. 137-42.
32. Zimmerman, B.J. and D.N. Granger, Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci*, 1994. 307(4): p. 284-92.
33. stojadinovib, Anti-inflammatory effects of U743S9F in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury. *crit care med*, 1999. 27: p. 764-770.
34. Conner, W.C., et al., Neutrophil priming state predicts capillary leak after gut ischemia in rats. *J Surg Res*, 1999. 84(1): p. 24-30.
35. Halliwell, B., Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 1994. 344(8924): p. 721-4.
36. Tamer, serbest radikaller. *MEÜ*, 2000. 1: p. 52-58.
37. Akkuş, serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *mimoza yayınları*, 1995: p. 1-80.
38. Weiss, S.J. and A.F. LoBuglio, Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest*, 1982. 47(1): p. 5-18.
39. McCord, oxygen derived free radicalsin postischemic tissue injury. *N engl J Med*, 1985. jan 17: p. 159-163.
40. Poole, J.W., R.J. Sammartano, and S.J. Boley, Hemodynamic basis of the pain of chronic mesenteric ischemia. *Am J Surg*, 1987. 153(2): p. 171-6.
41. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980. 288(5789): p. 373-6.

42. Ignarro, L.J., et al., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(24): p. 9265-9.
43. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987. 327(6122): p. 524-6.
44. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991. 43(2): p. 109-42.
45. Luscher, T.F., Endogenous and exogenous nitrates and their role in myocardial ischaemia. *Br J Clin Pharmacol*, 1992. 34 Suppl 1: p. 29S-35S.
46. Bassenge, E., Clinical relevance of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Br J Clin Pharmacol*, 1992. 34 Suppl 1: p. 37S-42S.
47. kalpaklıoğlu, nitrik oksit. *MN*, 1996. 4/2: p. 88-90.
48. Beckman, J.S., et al., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(4): p. 1620-4.
49. Radi, R., et al., Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 1991. 288(2): p. 481-7.
50. Stark, M.E. and J.H. Szurszewski, Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology*, 1992. 103(6): p. 1928-49.
51. Clancy, R.M., J. Leszczynska-Piziak, and S.B. Abramson, Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest*, 1992. 90(3): p. 1116-21.
52. Efron, D.T., et al., Nitric oxide generation from L-arginine is required for optimal human peripheral blood lymphocyte DNA synthesis. *Surgery*, 1991. 110(2): p. 327-34.
53. Ochoa, J.B., et al., Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg*, 1991. 214(5): p. 621-6.

54. Petros, A., D. Bennett, and P. Vallance, Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*, 1991. 338(8782-8783): p. 1557-8.
55. Park, J.H., et al., Protective effect of nitric oxide in an endotoxin-induced septic shock. *Am J Surg*, 1996. 171(3): p. 340-5.
56. Ignarro, L.J., et al., Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(17): p. 8103-7.
57. Kondo, K., et al., Simultaneous measurement of endothelium-derived relaxing factor by bioassay and guanylate cyclase stimulation. *Br J Pharmacol*, 1989. 98(2): p. 630-6.
58. Hecker, M., et al., Endothelial cells metabolize NG-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. 167(3): p. 1037-43.
59. Muller, C.D. and F. Schuber, Fluorometric determination of polystyrene latex: application to the measurement of phagosomes and phagocytosis. *Anal Biochem*, 1986. 152(1): p. 167-71.
60. Pai, use of chemiluminescence detector for quantitation of nitric oxide produced in assays of denitrifying enzymes. *anal. biochem*, 1987. 166: p. 150-7.
61. Green, analysis of nitrate,nitrit and nitrate in biological fluids. *Anal. biochem*, 1982. 126: p. 131-8.
62. granger, determination of nitrate and nitriti in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the griess reaction. *methods enzmology*, 1996. 268: p. 142-51.
63. Aydıner, deneysel testis torsiyonunda doku hasarının önlenmesinde Nasetilsisteinin rolü *Trakya Üni.*, 2005.
64. Cui, K., et al., Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2004. 28(5): p. 771-99.
65. Shah, P.C., et al., Effect of aging on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Mech Ageing Dev*, 1999. 107(1): p. 37-50.

66. Hirayama, K., A. Yasutake, and M. Inoue, Free radicals and trace elements. *Prog Clin Biol Res*, 1993. 380: p. 257-68.
67. Bird, R.P. and H.H. Draper, Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. *Methods Enzymol*, 1984. 105: p. 299-305.
68. Baykal Y., K.F., Serbest radikaller ve hücre hasarı. sendrom, 2000. 9: p. 31-39.
69. Onur, DNA hasarı ve onarım mekanizmaları. 2009. 7/2: p. 61.
70. Prabhulkar, S. and C.Z. Li, Assessment of oxidative DNA damage and repair at single cellular level via real-time monitoring of 8-OHdG biomarker. *Biosens Bioelectron*. 26(4): p. 1743-9.
71. Halliwell, B. and O.I. Aruoma, DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 1991. 281(1-2): p. 9-19.
72. Dizdaroglu, M., et al., Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med*, 2002. 32(11): p. 1102-15.
73. Dizdaroglu, M., Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett*. 327(1-2): p. 26-47.
74. Harri, M., et al., Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine using high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007. 853(1-2): p. 242-6.
75. Wu, L.L., et al., Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*, 2004. 339(1-2): p. 1-9.
76. E., A., oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *YYU veteriner fakültesi dergisi*, 2009. 20(2): p. 79-83.
77. Valavanidis, A., T. Vlachogianni, and C. Fiotakis, 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2009. 27(2): p. 120-39.
78. chen, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in leukocyte DNA of spermatic vein as a biomarker of oxidative stress in patients with varicocele. *journal of urology*, 2004. 172: p. 1418-21.

79. Hu, C.W., M.R. Chao, and C.H. Sie, Urinary analysis of 8-oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction: Study of 8-oxo-7,8-dihydroguanine stability. *Free Radic Biol Med.* 48(1): p. 89-97.
80. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, 1990. 280(1): p. 1-8.
81. girotti, lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *j lipid res*, 2000. 39: p. 1529-1542.
82. T,E., kan malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin önemi. *cerrahi tıp bülteni*, 2001. 2: p. 154-167.
83. Haga, S., et al., Hepatic ischemia induced immediate oxidative stress after reperfusion and determined the severity of the reperfusion-induced damage. *Antioxid Redox Signal*, 2009. 11(10): p. 2563-72.
84. akkuş, serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza yayınları*, 2000: p. 1-124.
85. Chen, H.F. and Y.R. Kou, Vagal and mediator mechanisms underlying the tachypnea caused by pulmonary air embolism in dogs. *J Appl Physiol* (1985), 2000. 88(4): p. 1247-53.
86. Kutty, R.K., et al., Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(4): p. 1177-81.
87. Nina fabjan, j.r., ıztok joze kosir, zhuanhua wang, and ı.k. Zheng zhang, Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin and Quercitrin. *American Chemical Society*, 2003.
88. Moskaug, J.O., Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech Ageing Dev*, 2004. 125(4): p. 315-24.
89. Nackz, phenolics in cereals, fruits and vegetables: Oeurrence, Extraction and analysis. *Journal Pharmaceutical and biomedical analysis*, 2006. 21: p. 1523-42.
90. stavric, Role of chemopreventers in human diet. *Clin Biochem*, 1994. 27: p. 319-332.

91. formica, Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol, 1995. 33(12): p. 1061-80., 1995. 33: p. 1061-80.
92. Bors, Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. Methods Enzymol, 1990. 186: p. 343-55.
93. Skaper, Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. . Free Radic Biol Med, 1997. 22: p. 669-78.
94. Hertog, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet, 1993. 342: p. 1007-11.
95. Cao, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. . Free Radic Biol Med, 1997. 22: p. 749-60.
96. grylewski, On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. . Biochem Pharmacol, 1987. 36: p. 317-22.
97. Medina, S.d., Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. Life Sci, 2002. 70: p. 3098-108.
98. Hai-dong, sulforafane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through nrf2-are pathway. world j gastroenterol, 2010. 28: p. 3002-10.
99. Chiu, C.J., et al., Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. Arch Surg, 1970. 101(4): p. 478-83.
100. Yagi, MethodsEnzymol AcademicPress,, 1984. 105: p. 328-31.
101. Ohkawa, Assayforlipidperoxides in animaltissuesbythiobarbituricacidreaction. . Anal Biochem, 1979. 95: p. 351-58.
102. Bradford, rapidandsensitivemethodforthequantitation of microgramquantities of protein utilizingthepriniple of protein–dyebinding. . Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-254.
103. W, T., Ischaemia and infarction. Genel Pathology Seventh Edition, 1996. 709-722.
104. Kazez, the role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. journal of pediatirc surgery, 2000. 35: p. 1444-1448.

105. Şener, the effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. blackwell science fundamental, 2001. 15(19-22).
106. Günel, treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. journal of pediatic surgery, 1998. 33: p. 1536-1539.
107. acworth, reactive oxygen species massachusetts, 1997: p. 1-4.
108. Mallick, ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. dis sci, 2004. 49: p. 1359-1377.
109. Mallick, pyrrolidine dithiocarbamate reduces ischemia-reperfusion injury of the small intestine. world j gastroenterol, 2005. 11: p. 7308-7313.
110. Camuesco, the intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. Br J Pharmacol, 2004. 143: p. 908-18.
111. Y, H., The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Rad. Bio!. Med, 1994. 16: p. 845-850.
112. Schroeter, Current status of the potential role of flavonoids in neuroprotection. Critical reviews of oxidative stress and aging:advances in basic science, diagnostics and intervention. World Scientific Publishing, 2003: p. 137.
113. Peterson, Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. Nutr. Res., 1998. 18: p. 1995-2018.
114. Burak, Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. T. Klin. TıpBilimleri, 1999. 19: p. 296-304.
115. Nijveldt, Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. Clin. Nutr, 2001. 74: p. 418-425.
116. Elliott, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Dmplications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews, 2000. 52: p. 673-751.
117. Kahraman, Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. J Nephrol, 2003. 16: p. 219-24.
118. Schroeter H, S.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. World Scientific Publishing, 2003. 1: p. 137.

119. Priya, Protective effect of quercetin in cisplatin-induced cell injury in the rat kidney. *Indian J. Pharmacol*, 1999. 31: p. 422-426.
120. Nakagawa, 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: p. 509-512.
121. Arivazhagan P, P.S., 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: p. 788-791.
122. Shoenberg MH., B.H., Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.*, 1993. 21: p. 1376-1386.
123. Masella, R., et al., Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 2005. 16(10): p. 577-86.
124. Halliwell, B., Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 1994. 344(8924): p. 721-4.
125. Shoskes, D.A., Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation*, 1998. 66: p. 147-52.
126. Huk, I., Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg*, 1998. 85: p. 1080-5.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Filiz YILDIZ'a ait “Sıçanlarda Oluşturulan Deneysel İntestinal İskemi Reperfüzyon Modelinde Quercitrin'in Etkileri Üzerine Etkisi” başlıklı tez çalışması jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: .../.../.....

Başkan :

Üye :

Üye :