T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA ÇİNKO ve MELATONİNİN ETKİSİ

Mine YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

KONYA-2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA DENEYSEL BÖBREK İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINDA ÇİNKO ve MELATONİNİN ETKİSİ

Mine YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 12202009 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Fizyoloji, insanın mükemmel yaratılışını inceleyen en önemli bilim dallarından biridir. Bense bu alanda henüz yüksek lisansımı tamamlamış bulunuyorum. Daha çok yolun başında olduğumun, araştırılacak, öğrenilecek, keşfedilecek daha çok şeyin olduğunun farkındayım.

Tüm yüksek lisansım süresince her türlü yardım ve fedakârlığı sağlayan, bilgi, tecrübe ve güler yüzü ile çalışmama ışık tutan, ayrıca bana bu çalışmayı vererek kendimi geliştirmeye yönelik de birkaç adım ileride olmamı sağlayan, çalışmamın yöneticisi Sayın Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ'a,

Her zaman bilgisiyle, tecrübesiyle benden desteğini hiç esirgemeyen, Saygıdeğer Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI'ya,

Tezimin hazırlanması sırasında bana yol gösteren, destek olan Uzm. Dr. Abdullah SİVRİKAYA ve Uzm. Dr. Mehmet ÖZ'e,

Bu süreçte beni cesaretlendiren ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocalarıma, arkadaşlarıma ve en başta da aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR vi.

1.GİRİŞ 1
1.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarı 2
1.1.1. Akut Hücre Zedelenmesinin Nedenleri 4
Geri Dönüşümlü Zedelenme 4
Geri Dönüşümsüz Zedelenme 5
1.1.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi 6
Serbest oksijen radikalleri 9
Nötrofiller 9
Kalsiyum 9
Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL) 13
Kompleman rolü 16
Endotel hücresinin rolü 17
1.1.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarında oluşan Biyokimyasal Değişiklikler 18
1.2. Böbreğin Fizyolojisi 19
1.2.1. Böbreğin Genel Yapısı 19
1.2.2. Nefron 20
1.2.3. Tübül ve Peritübüler Kapiller 20
1.3. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı 21
1.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oluşum Mekanizmaları 23
1.4.1. Biyolojik kaynaklar 24
1.4.2. Hücresel kaynaklar 24
1.5. Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü 25
1.5.1. Oksijen 27
1.5.2. Endoplazmik Retikulum 28
1.5.3. Peroksizomlar 28
1.5.4. Plazma Membranları 28
1.6. Serbest Oksijen Radikallerin Hücresel Etkileri 28

1.6.1. Membran Lipidleri ve Lipid Peroksidasyonu 29
1.6.2. Nükleik Asitler ve DNA 29
1.6.3. Proteinler 30
1.6.4. Karbonhidratlar 30
1.7. Serbest Radikallerin Hasar Mekanizması 31
1.7.1. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu 31
1.7.2. DNA hasarı 31
1.7.3.Lipid Peroksidasyonu 32
Malondialdehit (MDA) 35
1.8. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Doğal Savunma Mekanizmaları 36
1.8.1. Oksidan ve Antioksidan Mekanizmalar 37
Endojen antioksidanlar 39
Eksojen antioksidanlar 40
1.8.2. Glutatyon (GSH) 41
1.8.3. Çinko ve Antioksidan Özellikleri 46
1.8.4. Melatonin ve Antioksidan Özellikleri 51

2. GEREÇ ve YÖNTEM 55
2.1. Deney Hayvanları 55
2.2. Kan ve Doku Alımı 56
2.3. Kan ve Doku Analizleri 56
2.3.1. Protein Tayini 56
2.3.2. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi 57
2.3.3. Doku Glutatyon Analizi 57
2.3.4. Plazma Malondialdehid Seviyelerinin Belirlenmesi 58
2.3.5. Eritrosit Glutatyon Analizi 58
2.4. İstatistik 59

3.BULGULAR 60
3.1. Biyokimyasal Değerlendirme 60
3.2. Histopatolojik Değerlendirme 63

4.TARTIŞMA 71
5.SONUÇ ve ÖNERİLER 76

6. ÖZET 77
7. SUMMARY 78
8. KAYNAKLAR 79
9. EKLER 92
EK-A: Etik Kurul Kararı 92
EK-B: İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi (Sener ve ark 2007) 93

10. ÖZGEÇMİŞ 94

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP	Adenozin Monofosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
Ca^{+2}	Kalsiyum
DNA	Deoksiribonükleik Asit
GFR	Glomerüler filitrasyon hızı
GM-CSF	Granülosit-Mosonit Koloni Uyarıcı Faktör
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GRX	Glutaredoksin Redüktaz
GSH	Redükte Glutatyon
GSSG	Okside Glutatyon
HO_2	Hidroperoksil
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HOCI	Hipoklorik Asit
ICAM	İnterselüler Adhezyon Molekülü
ICAM-1	İnterselüler Adhezyon Molekülü 1
I.	Başlangıç Radikali,
IL-1	İnterlökin-1
IL-1β	İnterlökin-1 Beta
IL-6	İnterlökin-6
İ/R	İskemi-Reperfüzyon
İRH	İskemi-Reperfüzyon Hasarı
K^+	Potasyum
KDH	Ksantin Dehidrogenaz
KO	Ksantin Oksidaz

L.	Lipid Radikali
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOO.	Lipid Peroksit Radikali
LOOH	Lipid Hidroperoksitlerine
LT-B4	Lökotrien B4
MCP	Monosit Kemoatraktan Protein
MDA	Malondialdehit
MIP	Makrofaj İnflamatuvar Protein
Na^+	Sodyum
NAD^+	Nikotinadenindinükleotid
NADPH	Nikotinamid Dinükleotid Fosfat
NF-Kb	Nükleer Transkripsiyon Faktörlerinin
$NO^·$	Nitrik Oksit
NO_2	Azot Dioksid
NO_3^-	Nitrat
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
$O_2·^-$	Süperoksit Anyonu
O_3	Ozon
·OH	Hidroksil
$ONOO^-$	Peroksinitrit
ONOOH	Peroksinitroz asit
PAF	Trombosit Aktive Edici Faktör
PECAM-1	Trombosit-Endotel Hücresi Adhezyon Molekülü 1
PG	Prostaglandin
PMNL	Polimorfonükleer Lökositler
PSGL-1	P-selektin Glikoprotein 1

PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
R	Karbon Merkezli Radikaller
RNA	Ribonükleik Asit
RO	Alkoksil
ROO	Peroksil/Karboksil
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RS	Thiyl radikaller
-SH	Sülfhidril
SOD	Süperoksid Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TRX	Thiyol Transferaz
TxA_2	Tromboksan A_2
VCAM-1	Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü 1
Zn	Çinko
$^1O_2$	Singlet Oksijen
4-HNE	4-hidroksinonenal
6-HMS	6- Hidroksimelatoninsülfat

1. GİRİŞ

Bir organa gelen kan akımının çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesi veya durması iskemi olarak tanımlanır. Bu tür kan akımındaki bozulma ve dokularda iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı klinik olarak vasküler ve transplantasyon cerrahisi, turnike uygulaması, serbest doku transferleri, akut kompartman sendromu ve ampute ekstremitenin replantasyonu gibi durumlarda ortaya çıkabilir (Cotran ve ark 1995, Herbert ve ark 2001).

İskemiye bağlı olarak ilgili doku hipokside kalır ve bunun sonucunda doku hasarı ortaya çıkar. İskemi, hücrede enerji düzeyinin düşmesine ve toksik metabolitlerin dokuda birikmesine yol açarak hücrede fonksiyon bozukluğu ve sonrasında hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatır (Welbourn ve ark 1991).

Reperfüzyon ise doku kanlanmasının yeniden başlamasıdır. İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda (reperfüzyon), özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından salınan serbest oksijen radikalleri (SOR) dokudaki yıkım üzerinde daha fazla artırıcı etki yapar. Bu olay ise reperfüzyona bağlı doku hasarı olarak tanımlanır (Cotran ve ark 1995). Hasarın şiddeti iskeminin süresine, dokunun ısısına ve dokuya özgün faktörlere bağlı olarak değişir (Petrasek ve Walker 1994).

İskemi sırasında iskemik dokuda toksik oksijen radikalleri üretilir. Reperfüzyondan sonra serbest oksijen radikalleri ve süperoksit radikalleri endotel hasarına ve vasküler geçirgenliğin artmasına neden olur. Ayrıca aktive olan adezyon molekülleri ve sitokinler de sistemik inflamatuvar yanıtı başlatırlar. (Olguner ve ark 2006).

Serbest oksijen radikallerinin potansiyel zararlarını önlemek için vücutta bulunan çok sayıdaki hücre koruyucu enzimleri ile karşı koyarak, antioksidan maddeler ile radikal hasarı sınırlandırılmaya çalışılır. Sağlıklı vücutta hücresel antioksidan enzimler, antioksidan maddeler ve serbest radikallerin birbirleri arasında dengeli bir ilişki bulunmaktadır (Slater 1984, Delabar ve ark 1987).

İskemik ortamda doku adenozin trifosfat (ATP) düzeyi azalmakta, asidoz oluşmakta ve uzun iskemi sürelerinin ardından gelen reperfüzyon sonrası boşalan ATP depoları organ canlılığını sürdürmek için yeterli miktarda doldurulamamaktadır. Reperfüzyon sonrası ortama gelen nötrofiller ve bunlardan açığa çıkan mediatörlerin zararlı etkileri de eklenince organ veya doku ölümü kaçınılmaz olmaktadır (Hernandez ve ark 1987, Thornton ve ark 1989, Vedder ve ark 1989).

Serbest oksijen radikalleri (SOR) organizmada dokunun yapı elemanlarını bozarak zararlı etkilere yol açabilir. Oksidatif stres miyokardiyal hasar, pulmoner ödem, böbrek ve karaciğer yetmezliği gibi komplikasyonlar ve artmış mortalite ile yakından ilişkilidir (Küçükakın 2007). Hücrede serbest radikalleri uzaklaştırmak için çok sayıda antioksidan savunma mekanizması mevcuttur. Serbest radikaller durağan değildirler. Genellikle kendiliğinden güçlerini kaybederler. Ayrıca birçok enzimatik ve nonenzimatik sistem serbest radikallerin inaktivasyonuna neden olur. Çoğu hücrede bulunan süperoksid dismutazların (SOD) katalitik etkisiyle radikallerin kaybı belirgin olarak hızlanır. Glutatyon peroksidaz gibi enzimler serbest radikallere karşı koruyucudur. Peroksizomlarda bulunan katalaz hidrojen peroksidi enzimatik olarak parçalar. Ayrıca sistein, glutatyon, seruloplazmin gibi sülfidriller ile A, C ve E vitaminleri serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ya da onları inaktive eden endojen ve eksojen antioksidanlardandır (Aydıner ve ark 2012).

Mevcut çalışmanın amacı da sıçanlarda böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında üç hafta süreli çinko, melatonin ayrı ayrı ve kombine uygulamasının lipid peroksidasyonuna olan etkilerini belirlemektir.

1.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi-reperfüzyon hasarı (İRH) vücudumuzdaki tüm organlarda kendini gösterebilen ve yalnız meydana geldiği organla sınırlı kalmayan, pek çok organ ve sistemde olumsuz etkiler yapan patolojik bir durumdur (Çağlayan ve ark 1998). İskemi organı veya dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğe bağlı olarak gelişen dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku zedelenmesine neden olmaktadır. Geri dönüşümsüz hücre hasarını önleyebilmek için organa/dokuya yeniden kan akımının sağlanması gerekmektedir. İRH'yı önlemek amacıyla çoğunluğu deneysel

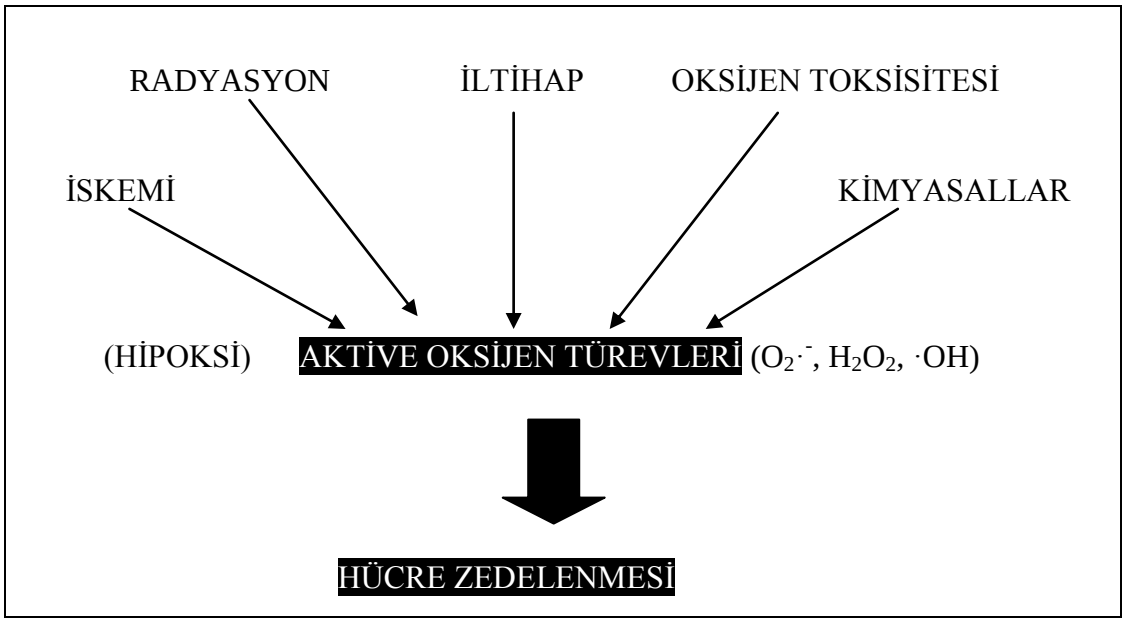
olan çalışmalarda, birçok farmakolojik ajan kullanılmıştır (Van den Heuvel ve ark 2009).

Reperfüzyon iskemi sırasında duran ya da yavaşlayan kan akışının yeniden normale dönmesidir. İskemik organda kan akışı her ne kadar normale dönse de iskemik organ, fonksiyonlarını kısmen geri kazanır (Manson ve ark 1983, Knight ve ark 1991). Kan akışı reperfüzyon ile düzenlenirken iskemi boyunca meydana gelen biyokimyasal ve moleküler değişimler serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olurlar (Manson ve ark 1983, Knight ve ark 1991). Süper oksit ($O_2 \cdot^-$) anyonu, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil ($\cdot OH$) en iyi bilinen serbest oksijen radikallerdir. Bu ürünlerin oluşumunda ksantin oksidaz (KO) sistemi ile difosfonükleotid (NADPH) sistemi etkin rol oynamaktadır (Morris ve ark 1993). Sonuçta reperfüzyon iskemik dokularda iskeminin dokuda oluşturduğu hasardan daha fazla bir hasara yol açabilmektedir (Kandilci ve ark 2005).

İskemi-reperfüzyondan (İ/R) en çok mikrovasküler damar endotel hücreleri etkilenir. Bu süreç boyunca oluşan serbest oksijen radikalleri endotel hücrelerinin şişmesine ve kapiller geçirgenliğin artmasına neden olur. Reperfüzyon oluşurken normale dönmeye çalışan kan akımı ile birlikte, hali hazır da bol miktarda salınmış bulunan inflamatuar substratların iskemik alana ulaşımı da sağlanır. Aktifleşen nötrofiller, inflamatuar hücrelerle birlikte bölgesel hasarın çok daha genişlemesine yol açar. Reperfüzyon hasarının boyutu dokudan dokuya değişmektedir. Deri ve kemik dokuları, iskelet kası ve intestinal mukozaya göre İ/R'ye daha dayanıklıdır. İskemi-reperfüzyon periyodunun uzunluğu ve derinliği, doku mikrosirkülasyonunun geri dönüşümünü, hücrenin temel yapı ve fonksiyonlarını değişik derecelerde etkileyerek hasarın büyümesine neden olmaktadır (İşlekel ve ark 2000, Siemionow ve ark 2004).

1.1.1. Akut Hücre Zedelenmesinin Nedenleri

Akut hücre zedelenmesi, uyarana karşı oluşur ve hücre morfolojisinde değişimler meydana getirir. İskemide aktive olan SOR lipid peroksidasyonuna ve hücre harabiyetine neden olur (Şekil 1.1.). Akut iskemiyi izleyen olaylar aşağıdaki şekilde gösterildiği üzere gelişir (Mitchell ve Cotran 2000).



Şekil 1.1. Akut hücre zedelenmesi nedenleri (Mitchell ve Cotran 2000).

Geri Dönüşümlü Zedelenme

a. Hipoksi, hücre hasarı ve ölümününün en sık nedenlerinden biridir. Hipokside, hücre içi oksijen azlığı nedeniyle aerobik solunum aksar ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. Adenozin trifosfat (ATP) üretimi azalır ya da tamamen sona erer. ATP kaybı sonucu ATPaz aktivitesi de azalır. Bu, hücre zarında bulunan aktif sodyum pompası yetersizliği ve beraberinde hücre içinde sodyum birikimi sonucunu doğurur. Hücre içi potasyum dışarı atılır. Ardından su hücre içine girer ve hücresel şişme meydana gelir. Hücresel şişmenin bir diğer nedeni ise katabolitlerin birikimidir (Mitchell and Cotran 2000).

b. Hücrenin enerji metabolizması bu süreç içerisinde glikoza bağımlı hale gelir. Glikojen depoları hızla azalır. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine, bu ise hücre içi pH'yı düşürerek asidoza neden olur.

c. Sonrasında granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır ve polizomlar monozomlara parçalanarak protein sentezi azalır. Hipoksi devam ederse membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları yavaşlar. Bu sırada mitokondriler normal, hafif yoğunlaşmış ya da şişmiş, endoplazmik retikulum ise genişlemiş olarak görülür. Sonuçta hücre belirgin biçimde şişer. Buraya kadar olan olaylar geri

dönebilir değişikliklerdir. İskemi bu andan sonra da devam ederse, geri dönüşümsüz hücre zedelenmesi başlar. Hücre hasarının yapısal değişiklikleri, bazı kritik biyokimyasal sistemlerin bozulmasından sonra görünür hale gelir. Hücre şişmesi geri dönüşümlü bir hasardır ve dakikalar içinde görülebilir. Hücre ölümü, örneğin miyokard bulguları tam iskemiden 10-12 saat sonrasına kadar ışık mikroskobu ile görülmemektedir. Geri dönüşümsüz hasar son bilgilere göre ilk 20-60 dakika içinde oluşur (Mitchell ve Cotran 2000).

Geri Dönüşümsüz Zedelenme

Geri dönüşümsüz hücre zedelenmesinde mitokondri ve kristalarda aşırı vakuolizasyon ile plazma zarında aşırı zedelenme vardır. Hasarlanmış ve ileri derecede geçirgenleşmiş zarlardan hücre için gerekli yaşamsal elemanların kaybolduğu görülür. Hücre içi pH'nın düşmesi, lizozom zarlarının zedelenmesi ve beraberinde enzimlerin sitoplazmaya geçerek asit hidrolazları aktiflemesi sonucu, çekirdek ve sitoplazma yapıları sindirilir. Hücre zedelenmesinde en önemli basamak kuşkusuz membran zedelenmesidir. Hücre membran zedelenmesinin altı farklı nedenden kaynaklandığı kabul edilmektedir. Bu nedenler şu şekilde sıralanır;

1. Mitokondri fonksiyon bozukluğu,
2. Membran fosfolipidlerinin giderek artan kaybı,
3. Hücre iskeletindeki değişimler,
4. SOR,
5. Lipid yıkım ürünleri,
6. Hücre içi aminoasidlerin kaybı.

Membran zedelenmesi, hücrelerarası mesafeden hücre içine doğru kalsiyum (Ca^{+2}) tutulumuna neden olur. Reoksijenasyondan sonra mitokondri tarafından tutulan Ca^{+2} hücresel enzimleri inhibe ve proteinleri denature eder. Sonuçta koagülasyon nekrozuna özgü hücresel değişimler meydana gelir.

İskemi sonrasında dokuda dolaşımın yeniden başlaması, reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. İskemi sonucunda artan SOR kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon zedelenmesine yol açar. Reperfüzyon oluşmazsa, öldürücü iskemik

zedelenme gelişir fakat toksik SOR oluşmaz. Reperfüzyon sırasında iskemik alanda toplanan nötrofil ve trombositlerin aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} birikimi ile mikrovasküler hasarın dokudaki zedelenmenin nedeni olduğu bilinmektedir. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde iskemik alanda toplanan polimorf nüveli lökositler tarafından yapıldığı düşünülmektedir (Mitchell and Cotran 2000, Türkyılmaz 2003).

1.1.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

İ/R sonrası dokularda mikrovaskuler fonksiyon bozukluğu gelişir. Arteriyollerde endotele bağımlı dilatasyon bozulur. Kapillerlerde lökosit tıkaçları oluşur, sıvı filtrasyonu artar. Postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına çıkması ve lökositlerin hareketliliği başlar. Mikrosirkulasyonun bütün segmentlerinde aktive olan endotel hücreleri daha fazla serbest oksijen radikalleri (SOR) ve daha az nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) üretir. Endotel hücrelerinde süperoksit radikali ve nitrik oksit arasındaki dengesizlik inflamatuar mediyatörlerin üretim ve salınımına öncülük ederken adhezyon moleküllerinin biyosentezini de arttırır (Chamoun ve ark 2000) (Bkz. EK- B).

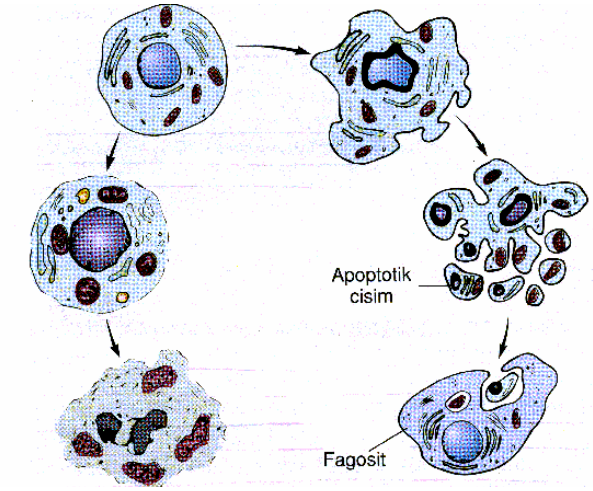
Hipoksi sırasında adenozin trifosfat (ATP) üretimi durmasına rağmen kullanımı devam eder. Yüksek enerjili ATP'nin fosfat bağlarının kırılmasıyla adenozin monofosfat (AMP) oluşur. Daha ileri aşamalarda ATP adenozine kadar indirgenir. Adenozin, inozin üzerinden hipoksantine indirgeneceği ekstraselüler aralığa hızla dağılır (Schoenberg ve ark 1990). Yapılan bir çalışmada, 2 saatlik iskeminin ATP konsantrasyonunu iskemi öncesi değerinin yaklaşık %40'ına düşürdüğü, bu düşüşün barsak dokusunda AMP'nin yaklaşık 8 kat, hipoksantinin 10 kat arttığı gösterilmiştir (Schoenberg ve ark 1985). Normal dokularda hipoksantin, ürik aside dönüşür. Hipokside ise hipoksantin daha fazla metabolize edilemez ve birikir. Aynı zamanda iskemide ksantin dehidrogenazın büyük bir kısmı ksantin oksidaza dönüşür. Bu dönüşümün büyük bir kısmı iskeminin başlaması ile ilk dakikada gerçekleşir. Reperfüzyonun başlaması ile ksantin oksidaz hipoksantini ksantine, sonra da ürik aside dönüştürür. Bu basamakta serbest oksijen radikalleri oluşur.

Uzamış iskemi hücrede metabolik ve yapısal değişikliklere neden olur. İskemi hücresel oksidatif fosforilizasyonu azaltır. Hücre membranında adenozin trifosfat (ATP) bağımlı iyon pompası fonksiyonunun bozulması sonucu hücre içine kalsiyum (Ca^{+2}), sodyum (Na^{+}) ve su girişi artar. İskemi sırasında adenin nükleotit katabolizması sonucu hücre içinde hipoksantin birikir. Bu arada endotelde bazı proinflamatuar ürünlerin (lökosit adhezyon molekülleri, sitokinler) ve biyoaktif ajanların (endotelin, tromboksan A_2) yapımı artarken, diğer bazı koruyucu ürünlerin (yapısal nitrikoksit sentaz, trombomodulin) ve biyoaktif ajanların (prostosiklin, $NO^{\cdot}$) yapımı baskılanır. Böylece iskemi, daha sonraki reperfüzyon döneminde doku zedelenebilirliğini arttıran proinflamatuar bir durum başlatır.

İskemik dokuların reperfüzyonu ile iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak, bir kısım hücre nekroz veya apoptozis ile ölmeye devam eder. Etkilenen dokularda sıklıkla nötrofil infiltrasyonu gözlenir. Parenkimal hücreler, endotel hücreleri ve lökositlerce SOR yapımı artar. Bu arada hasarlı mitokondrilerde oksijen yetersizliği veya alternatif yollardan oksijenin indirgenmesi ile de SOR oluşabilir. Hücresel antioksidan savunma sistemleri de iskemi nedeniyle zayıflar. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar.

Apopitozis, programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Bir grup protein ve gen ekspresyonunun birlikte işlemesi sonucunda meydana gelir. Gen ekspresyonu ile birlikte çekirdekteki deoksiribonükleik asit (DNA) kırılır, kromatin çekirdekte yoğunlaşır, çeperde toplanır, sitoplazma büzüşür, bu esnada hücre membran bütünlüğü ve mitokondrinin dış yapısı korunur. Sonunda hücre apopitotik cisimcikler oluşturarak parçalanır. Bu cisimcikler yakınındaki yerleşik hücreler, bölgesel makrofajlar, mikroglial hücreler tarafından abartılı bir inflamatuar reaksiyon olmadan fagosite edilirler (Clarke 1990, Majno 1995, Chalmers- Redman ve ark 1997).

Nekrotik hücre ölümü ise apopitozdan çok farklıdır. Hücre şişmesi, membran bütünlüğünün kaybı ve belirgin inflamasyon ile karakterizedir. DNA iplikçikleri, apopitozdaki gibi internükleozomal bağlantı noktalarından, düzenli olarak kırılmaz, rastgele olacak şekilde kırılır (Ankarcrona ve ark 1995, Majno ve ark 1995, Patel ve Gores 1995, Rust ve Gores 2000, Sastry ve Subba 2000).



Nekroz Apopitoz

Şekil 1.2. Apopitotik ve Nekrotik Hücre Ölümlerin (Yavuzer 2008).

Canlı hücrelerinin reperfüzyondan hasar görmelerinde apopitozisin önemli bir faktör olduğu, hem hayvan deneylerinde, hemde klinikte transplantasyon çalışmalarında gösterilmiştir (Hwang ve ark 1986, Nagano ve ark 1999).

Reperfüzyon sonucunda pre-apopitotik proteinler olan caspase-3 ve caspase-8'in aktivasyonu ile apopitoz tetiklenir. Caspase-3 ve caspase-8 birlikte mitokondrial membran yapısında ve fonksiyonlarında bozulmaya yol açmanın yanısıra sitoplazmaya sitokrom C vitamini salınımına ve bunun sonucunda nükleer DNA'nın yıkılarak hücrenin ölmesine sebep olmaktadır (Preisler ve ark 2001, Micha ve ark 2002).

Apopitozu başlatan genler, ölüm sinyallerini hücre dışında bulunan ölüm reseptörleri aracılığı ile hücre içine iletirler. Ölüm reseptörleri, tümör nekrozis faktör (TNF) reseptörünün üst ailesine aittirler ve TNF R-1, FAS ve p75 NTR'yi içerirler. Ölüm sinyalinin dışarıdan gelmesi şart değildir hücre içerisinde hasarlanmış DNA, endoplazmik retikulum veya mitokondride bu sinyalin kaynağı olabilir (Ankarcrona ve ark 1995, Rust ve Gores 2000, Preisler ve ark 2001).

İ/R hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücresel ve humoral olaylar serisi olup, bu

hasardan başlıca 4 tür molekül sorumludur (Homer ve ark 1997, Monsinjon ve ark 2001).

a. Serbest oksijen radikalleri
b. Polimorf nüveli lökositler (PMNL)
c. Kompleman
d. Endotel olmak üzere başlıca dört komponentten sözedilebilir.

a. Serbest Oksijen Radikalleri

Nötrofiller

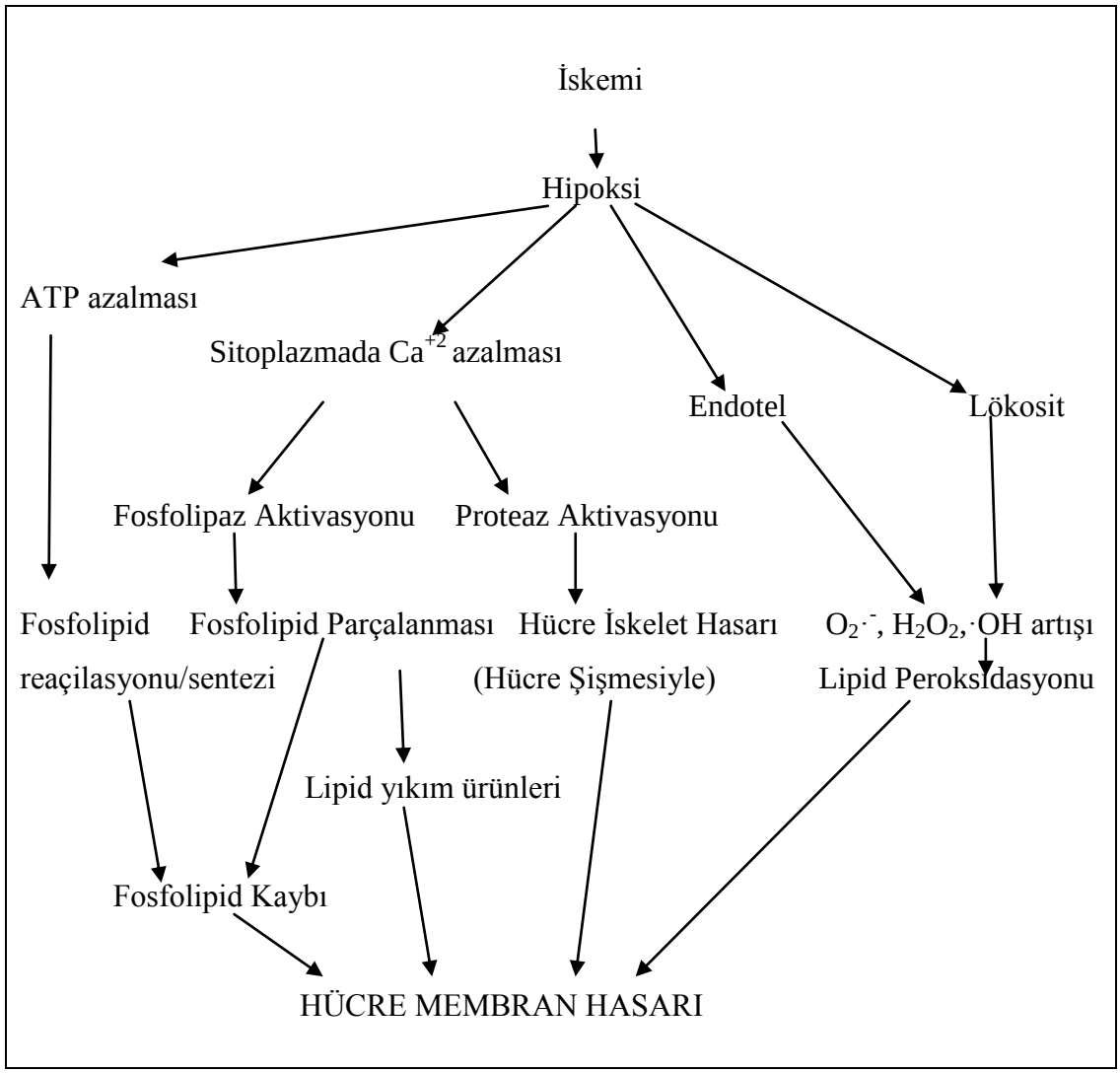
İskemi sonrasında damar endotelinin hasar görmesi ile nötrofil ve trombosit aktivasyonu meydana gelmektedir. Bunun yanısıra, iskemik alanda ortaya çıkan kemotaktik faktörlerden kompleman 3a ve kompleman 5a nötrofillerin bölgeye göç etmesine neden olur. İskemi reperfüzyon alanına gelen nötrofiller, bu bölgede SOR üretir. Ortaya çıkan SOR antiproteazları inaktive eder. Sonuçta, lizozomlardan proteolitik enzimler salınarak hasar oluşur. Ayrıca nötrofiller de uyarılmaları sonucunda esnek yapılarını kaybederek mikrosirkülasyonda kalır ve embolizasyona neden olurlar (Türkyılmaz 2003).

Kalsiyum

Reperfüzyon sırasında hücre ve organelleri içinde aşırı Ca^{+2} birikimi ciddi doku hasarı gelişiminin en önemli nedenidir. İskemide ortaya çıkan hücre membran hasarı ve gradient farkı nedeniyle Ca^{+2} hücre içine girer. Aynı zamanda iskemi-reperfüzyon sırasında, özellikle SOR tarafından sodyum-potasyum pompasının bozulmasıyla artan hücre içi sodyum Ca^{+2}'yı daha da artırır. Dışarıdan Ca^{+2} girişinin yanısıra, endoplazmik retikulum da iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı membran zedelenmesi sonucu içerdiği Ca^{+2}'yı sitoplazmaya bırakır.

Normal koşullarda hücre için yararlı olan Ca^{+2}'nın reperfüzyon sonrasında hücre içinde aşırı miktarda birikmesi sonucu ortaya çıkan hasara kalsiyum paradoksu denilmektedir. Artan hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu ATPaz enziminin

inaktivasyonuna neden olur. Böylelikle iskemide zaten azalmış olan ATP depoları daha da boşalır. Hücrede litik görevi olan birçok enzimin Ca^{+2} tarafından aktive edilmesiyle hücre yıkımı başlar. Membran fosfolipidlerinin, aktive olan fosfolipaz tarafından parçalanması sonucu ise hücre bütünlüğü bozulur (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. İskemide membran hasarı (Türkyılmaz 2003).

İskemi sonrasında endotel ve hücre zarı fonksiyonlarının bozulmasıyla hem hücre içinde, hem de hücre dışında ödem görülür. Endotel hücrelerinde şişme ile damar dışı boşluğa sızan sıvının neden olduğu bası sonucu kapiler damar lümeni daralır ve sonuçta reperfüzyon olsa da mikrosirkülasyonda ciddi yetersizlikler ortaya çıkar. Reperfüzyon ile iskemide bozulmuş mikrosirkülasyonun tam olarak düzeltilememesine "no-reflow olayı" denir. Dokuda ortaya çıkan ödemin yanısıra

aktive olan nötrofil ve trombositlerin kapiller dolaşımda kalmaları bu tabloya katkıda bulunmaktadır (Taşkıran 2002).

Normal şartlarda:

$$\text{Hipoksantin} + NAD^{+} \xrightarrow{\text{KDH}} \text{Ksantin ve ürik asit} + NADH + H^{+}$$

İskemide:

ATP ⟶ hidrolizlenir ⟶ AMP ve ADENOZIN

ADENOZİN hücre dışına geçer ⟶ inozin ve hipoksantin

AMP ⟶ Hipoksantin

KDH ⟶ KO

Reperfüzyon ile:

$$\text{Hipoksantin} + H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{KO}} \text{Ksantin} + H_2O_2$$

$$\text{Ksantin} + 2O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{KO}} \text{Ürik asit} + H_2O_2$$

Mitokondriyal oksijen düzeylerinin iskemiyle azalmasıyla birlikte, kas hücrelerinde aerobik metabolizma azalır. Hücrenin enerji depoları homeostatik fonksiyonları devam ettirebilmek amacıyla tüketilir. Adenozin trifosfat (ATP) gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı hipoksantinin birikmesine neden olur. Reperfüzyon olmadığı sürece biriken hipoksantin ksantine dönüştürülemez. Kas hücreleri enerji üretimi için oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolize geçer ki, bunun sonucunda glukoz ve pirüvat azalırken, hücre içi laktik asit üretimi artar. Aynı zamanda, iskemi sürecinde mikrovasküler endotelyumda bulunan ksantin

dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaz enzimine dönüştürülür (Lindsay ve ark 1990). Reperfüzyonda reoksijenizasyonun sağlanmasıyla, iskemi sırasında oluşan ksantin oksidaz enzimi, biriken hipoksantini ksantine dönüştürürken çok sayıda serbest oksijen radikalininde ortama çıkmasına neden olur (McCord 1985, Concannon ark 1992). Oksijen öncelikle süperoksite ($O_2^{\cdot -}$), ardından da hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikaline ($^{\cdot}OH$) dönüşür. Nötrofillerde bulunan membran bağımlı NADPH oksidaz enzimi ise, iskemi sırasında hücre içerisine kalsiyum akışıyla birlikte aktive olur. Aktive olan enzim NADPH'yi $NADP^+$'ye çevirirken reperfüzyonda sağlanan moleküler oksijende süperokside ($O_2^{\cdot -}$) indirger (Grisham ve Granger 1989b).

Oksijen serbest radikallerinin reperfüzyonda ani ve çok sayıda açığa çıkması direkt endoteliyal hasara neden olduğu gibi postiskemik dokulara nötrofil infiltrasyonuna neden olarak oksidatif hasarı daha da artırır (Kharbanda ve ark 2001). Nötrofillerin postiskemik dokulara toplanmasıyla birlikte yüzeylerindeki adezyon molekülleride (CD11 / CD18) aktive olur ve vasküler endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan karşı reseptörlerle (ICAM-I) reaksiyona girerler. Oluşan CD18 / ICAM-I kompleksi, nötrofillerdeki oksidanların kas hücrelerine geçişini sağlarken, endotel hasarıyla mikrovasküler bariyeride bozarak iskemi sonrasında kaslarda kapiller düzeyde akımın olmamasına (no-reflow fenomeni) neden olur (Gute ve ark 1998). Dolayısıyla turnike açılıp akım tekrar sağlansa bile hücre düzeyinde beslenme bozulur.

Normal şartlarda vücudun antioksidan defans sisteminde yer alan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi endojen enzimler serbest oksijen radikallerini etkin bir şekilde detoksifiye ederken, iskemi ve onu takiben reperfüzyonla çok sayıda serbest radikalin aniden ortaya çıktığı durumlarda yetersiz kalmaktadırlar (McCord 2000).

Hücredeki tüm biyomoleküller içerisinde oksidatif hasara en hassas olan membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleridir. Reperfüzyonla açığa çıkan süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) hidroksil radikaline ($\cdot OH$) dönüşerek hücre membranında lipit peroksidasyonunu başlatabileceği gibi, endotel kaynaklı nitrik oksitle ($NO^{\cdot}$) reaksiyona girip "peroksinitrit" oluşumuna neden olarakta lipit peroksidasyonunu başlatabilir (Radi ve ark 1991). Lipit peroksidasyonu bir kez başladıktan sonra kendi

kendini devam ettiren zincirleme bir dizi reaksiyon şeklinde ilerler. Bu reaksiyonun sonucunda malondialdehit (MDA) gibi biyolojik olarak aktif ve hücre membranında parçalanmaya neden olan aldehitler açığa çıkar (Grisham ve Granger 1989a). Dokuya infiltre olan aktive nötrofiller, serbest radikallerle olan mekanizma dışında, direkt olarak proinflamatuvar sitokinlerin açığa çıkmasını kolaylaştırarak doku hasarını artırabilirler. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, proinflamatuvar sitokinlerden özellikle tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-α), interlökin-1 beta (IL-1β) ve IL-6'nın, iskelet kası iskemi reperfüzyonunda plazmadaki düzeylerinin belirgin olarak arttığı ve bu sitokinlerin aracılığıyla hem lokal hasarın daha da artırıldığı, hem de uzak organ hasarının tetiklendiği gösterilmiştir (Germann ve ark 1997, Seekamp ve ark 1993). Plazmada miktarları artan bu sitokinler böbrek, kalp, karaciğer ve akciğer gibi uzak organlarda nötrofil-endotel reaksiyonuna veya apopitozise neden olarak hasarı başlatmaktadırlar (Barry ve ark 1997, Akgun ve ark 2004, Lu ve ark 2006).

b. Polimorf Nüveli Lökositler (PMNL)

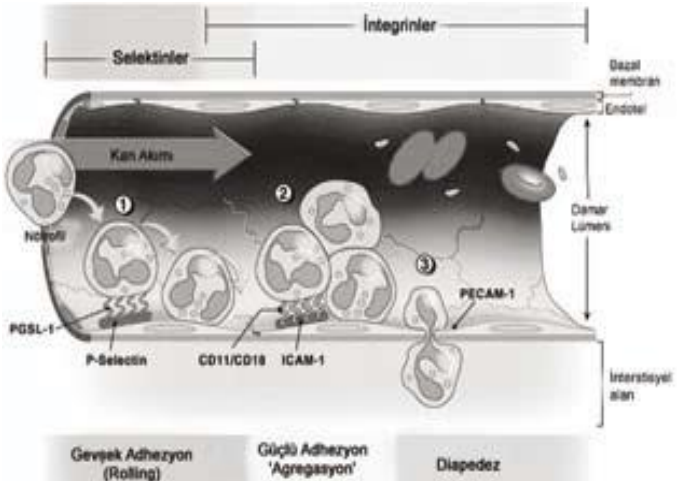
Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir (Lopez-Neblina ve ark 1996). İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir (Frangogiannis 2007). Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir.

İskemi-reperfüzyon hasarında PMNL'nin rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (Eltzschig ve Collard 2004).

Bunlar:

1) Mikrovasküler oklüzyon,
2) SOR salınması,
3) Sitotoksik enzim salınması,
4) Vasküler permeabilite artışı,
5) Sitokin salınması artışıdır.

PMNL'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur. Selektinler olarak bilinen adhezyon moleküllerinin L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İ/R, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu arttırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur (lökosit rolling). İkinci aşamada, lökosit beta2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasındaki etkileşim sonucunda lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşama ile trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktive lökositler damar dışına ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis) (Woodfin ve ark 2007) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Lökosit-endotel etkileşiminde lökosit adhezyon molekülleri ve lökosit göçünün şematize edilmesi (Woodfin ve ark 2007).

Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1 (IL-1), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandin (PG) türleri vardır. Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-kB) aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör (TNF-a) sentezine yol açar (Frangogiannis 2007). Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu maddeler, mast hücrelerinden selektin ve ICAM (İnterselüler adhezyon molekülü) gibi adhezyon moleküllerini mobilize eden inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını uyarırlar. Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra,

damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar (Zimmerman ve ark 1992). Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apopitozis gelişmesi, normalde immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir (Vinten-Johansen 2004). Hücresel ölüm yolağındaki düzensizlikler, iskemi-reperfüzyon hasarının yanı sıra, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da yol açabilmektedir. Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir:

- Fosfolipaz A2 aktivasyonu ile araşidonik asit metabolitleri (prostaglandinler ve lökotrienler) üretilir.
- Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır.
- SOR üretimi gerçekleşir (Schoenberg ve Beger 1993, Weight ve ark 1996).

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü aracılarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyaranın etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşım yoluyla ortamdan uzaklaştırılırlar (Schoenberg ve ark 1993, Zimmerman ve Granger 1993).

İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, post-kapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda $O_2^{\cdot -}$ oluşurken $NO^{\cdot}$ oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile $NO^{\cdot}$ arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF-a gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna

aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur (Weight ve ark 1996, Chatterjee 2007).

Serbest radikallerin oluşumunda ve İRH'da önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz ezimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; aktive nötrofillerde ksantin-oksidaz'ın artması ile SOR'un salınması "solunum patlaması" olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen perokside dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kollajenaz ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (Korthuis ve Granger 1993).

c. Komplemanın Rolü

İRH'da kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proinflamatuar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)- 1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır (Thrane ve ark 2007).

- Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1)
- İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1)
- E-selektin

- P-selektin

C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi arttırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (Zhang ve ark 1999).

d. Endotel Hücresinin Rolü

İRH'nın oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelin ve $NO^{\cdot}$'yu üretir. $NO^{\cdot}$ arteriyel dolaşımda endotelin vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin $NO^{\cdot}$ oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur (García-Villalón ve ark 2008).

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak IL-1, trombosit aktive edici faktör (PAF), prostaglandinler (PGI_2, PGE_2), granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), büyüme faktörleri, endotelin, $NO^{\cdot}$ ve tromboksan A_2 (TxA_2) salgılarlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir (Weight ve ark 1996, Özel 2006).

Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipit radikallerle tepkimeye girmesi $NO^{\cdot}$'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen $NO^{\cdot}$, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO_3^-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında $NO^{\cdot}$ derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler

$NO^{\cdot}$'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücresel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler (Phillips ve ark 2009).

İyon ve organik moleküllere geçirgenlikte bariyer oluşturması, prostaglandinlerin dolaşımdan kısmen uzaklaştırılması, akciğerlerde Anjiotensin I'in Anjiotensin II'ye dönüştürülmesi ve koagulasyondaki rolü, endotel hücresinin bilinen klasik görevlerindendir. Endotel hücresinin yukarıda sayılan işlevlerine ek olarak, vazomotor etkinlikleri düzenlemesi ve hasara cevap olarak salgıladığı mediyatörler nedeniyle giderek daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır.

1.1.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarında oluşan Biyokimyasal Değişiklikler

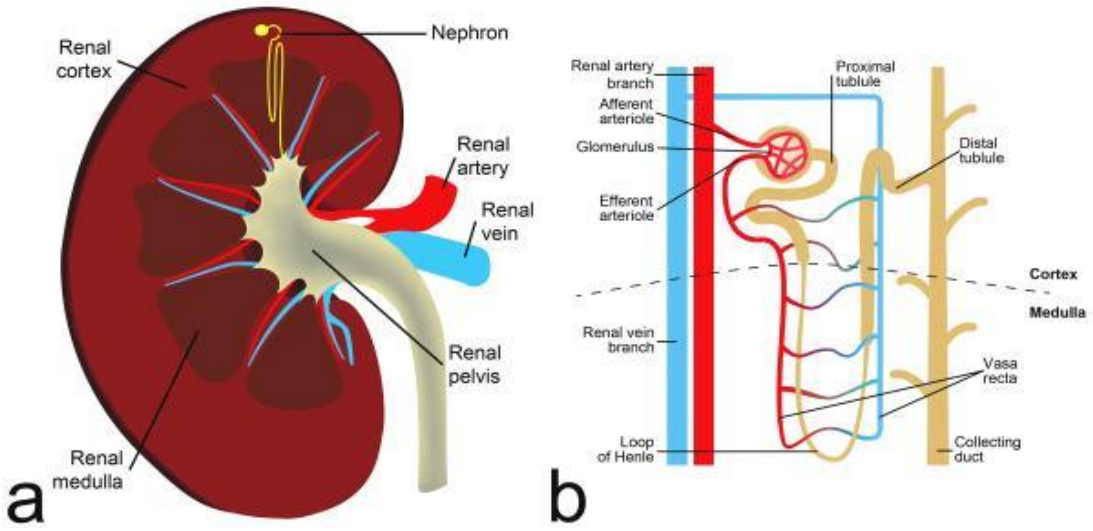
Oksijen eksikliğinde hücre metabolizması anaerobik glikolize yönelerek, krebs döngüsü ve elektron transport zinciri devre dışı kalarak, piruvat laktata çevrilir. 36 ATP'lik aerobik metabolizmadaki enerji üretimi anaerobik olana göre 18 kat fazladır. Substrat başına daha az enerji üretilmesine rağmen, enerji üretebilmek için daha fazla substrat metabolize edilir. Metabolizmadaki artışın enerjideki azalmayla sonuçlanması Pastör etkisi olarak adlandırılır (Guppy ve ark 1995). Hücre enerjisinin %60'ı sodyum–potasyum (Na^+/K^+) pompasında, %40'ı ise hücre fonksiyonlarında kullanılır. Sonuçta enerji üretimi için gerekli substratlar bitince Na^+/K^+ pompası durur, sodyum (Na^+) hücre içinde birikir hücre şişer. Hücre içinde potasyum (K^+) miktarında azalış meydana gelir. K^+'un hücre dışı akımı dengesizliğe neden olup voltaj bağımlı kalsiyum (Ca^{+2}) kanallarını uyarır ve sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınır. İntrasellüler Ca^{+2} toksik düzeye ulaşınca membran fosfolipidleri hidrolize uğrar. ATP eksikliğine bağlı olarak granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomlar ayrılır disfonksiyone olması nedeniyle protein sentezi durur. Laktik asit artışı ile pH düşer. Deoksiribonükleik Asit (DNA) ve Ribonükleik Asit'de (RNA) sarılma ve kümelenme oluşur. Transkripsiyonun gerçekleşememesi sonucu protein sentezi durur. Yaşamsal protein ve enzimlerin sentezlenememesi sonucu, membran lizisi ve hücre ölümü oluşur. Bu reaksiyonlar zinciri öldürücü olsa da, baslangıçta oksijen ve kan akımı hızla sağlandığında geri dönüşümlüdür. Mitokondri bozulmamış iken ATP üretilir, Na^+/K^+ pompası çalışır, intrasellüler laktik asit okside edilebilir ve DNA hasarı ortadan kalkar. Lizozomlar hasarlı hücresel yapıları sindirir, yıkılanlar yerine

konularak olay geri döner (Kumar ve ark 1995). Anoksi uzun sürdüğünde ise hücre hasarı geri dönüşümsüzdür. İ/R hasarı patogenezinde, inflamatuar mekanizmaların major rol oynadığı ön görülmektedir. Bu mekanizmada lökosit, lökosit adhezyon molekülleri ve sitokinler rol oynamaktadır. Ayrıca mekanizmalardan birisi de oksidatif strestir. Oksidatif strese bağlı olarak kan-beyin bariyeri yıkıma uğramakta ve lipid peroksidasyonu oluşmaktadır (Saray ve ark 1999).

1.2. Böbreğin Fizyolojisi

1.2.1. Böbreğin Genel Yapısı

Böbrek ağırlıklı olarak periferal bir korteks ve dahilinde piramit denilen koni biçimindeki dokuların çoklu bulunduğu yapılar olan daha merkezi konumda bulunan renal medulladan oluşur (Şekil 1.5.a). Her piramidin uçları kaliks olarak bilinen alanda böbreğin merkezinin yakınında birleşir. İdrar renal pelviste toplanır ve daha sonra mesane içine üreter aracılığıyla akar. Renal pelviste bulunan renal hilus renal venin kökeni ve renal arterin distal ucunu kapsar. Hem sağ hemde sol renal arterler kardiyak outputun ~%10'nu alır. Bilgisayarlı tomografi tekniğiyle yapılan ölçümlere göre böbrek korteksinde kan reperfüzyonu ~400-500 ml/min/100g iken, medullada ise daha az olmakla beraber ~100-150 ml/min/100g'dır (Miles 1991, Zhao ve ark 2010).



Şekil 1.5. (a) Böbreğin koronal kesiti; (b) Nefronun şematik diyagramı (Zhang ve ark 2013).

1.2.2. Nefron

Tipik bir nefron 1 milyon nefron ihtiva eder. Herbir nefron, reabsorbsiyon ve sekresyonun yer aldığı tubül ve renal korpüskül denilen bir filitreleme komponentinden oluşurlar (Şekil 1.5.b). Küre şeklindeki renal korpuskül, glomerulüs denilen kapiller yumağından demeti tutan Bowman kapsülü dış komponenti oluşturur. Afferent arterioldeki kan glomeruluslara girer, filitre edilir ve efferent arteriolle çıkar. Filitrasyon, ilkin glomeruler membran aracılığıyla, ikinci olarak Bowman kapsülüne ve daha sonra proksimal tubüle gelen renal plazmanın yaklaşık %20'sinin süzülmesiyle sonuçlanır. Bu sıvıya molekül ağırlığı <6000 Dalton olan çözeltiler katılır. Glomerüler filitrasyon hızı (GFR, ml/min) normalde her iki böbrek için 60 ml/min civarında veya ~120 ml/min'dir. Bu büyük fark kana geri verilen glomerüler filtrasyonun reabsorbsiyonundandır (Zhang ve ark 2013).

1.2.3. Tubül ve Peritubüler Kapiller

Renal tubül Bowman kapsülüne uzanır ve proksimal tubül, henle kulbu ve distal tubülden oluşur. Proksimal tubül ve distal tubül çoğunlukla renal korteksdedir ve proksimal tubülle distal tubülü bağlayan henle kulbu renal medullanın derinindedir (Şekil 1.5.b). Distal tubül nihai kalikste sonlanan bir toplama kanalına katılır. Renal kortekste peritubüler kapiller proksimal tubül ve distal tubül etrafında dağıtılır. Bazı efferent arterioller inen vasa rectadan dolayı medullaya kadar uzanır (Şekil 1.5.b). Tubüllerden su ve solütlerin reabsorbsiyonu kapiller ve vasa recta yoluyla dolaşıma tekrar katılır (Zhang ve ark 2013).

1.3. Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Böbreklerde sistemik hipotansiyon, hipovolemik şok, kardiyak arrest, renovasküler cerrahi, aortun klemplenmesi ve organ hasarı gibi klinik durumlar sırasında akut iskemi-reperfüzyon hasarı oluşabilmektedir (Woolfson ve ark 1994, Weight ve ark 1996, Donnahoo ve ark 2000). Bu hasarın şiddeti iskemi stresine paralel olarak artmakta, sonuçta belirgin doku hasarı olmaksızın gelişen prerenal

azotemiden, tubüler veya kortikal nekroza bağlı ciddi akut böbrek yetmezliğine kadar değişebilen farklı klinik tablolar karşımıza çıkabilmektedir (Dosluoglu ve ark 1993, Woolfson ve ark 1994, Sivarajah ve ark 2003).

Renal iskemi reperfüzyon, akut böbrek yetmezliğinin en önemli etken mekanizmalarından biridir (Hassoun ve ark 2007). Akut böbrek yetmezliği sırasında yüksek mortalite oranı çoğunlukla uzak organ disfonksiyonundan kaynaklanmaktadır. Renal iskemi reperfüzyon hasarı akciğer, beyin ve karaciğer gibi diğer sistemlerin yetmezliğine neden olabilir (Hassoun ve ark 2007, Golab ve ark 2009).

Reperfüzyon paradoksal bir şekilde daha karmaşık reaksiyonlar zincirini tetiklemek suretiyle sonuçta böbrekte nekroz ve apoptozisle sonuçlanan olaylara yol açar. Renal hücrelerdeki iskemi/reperfüzyon hasarının altında yatan mekanizmalar muhtemelen çok faktörlü olup, bunlar arasında hipoksi, yangı ve serbest radikaller bulunmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin yüksek düzeyi yaralanmada kritik bir rol oynayıp, bu süreçte hücre hasarına neden olur (Parks ve Granger 1986). Hasar oluşumunu önlemek veya meydana gelen hasarı tekrar düzeltmek için çok sayıda ajan deneysel olarak araştırılmıştır (El-Kossi ve ark 2011).

Birçok hastalığın oluşması ve patolojik durumun ortaya çıkmasında serbest radikallerin önemli rolü vardır (Porter 1984, Southorn ve Powis 1988, Aruoma ve ark 1991). Serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan maddeler tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılır (Da Silva ve ark 1998).

Böbrek nakillerinde kullanılan soğuk iskemi/reperfüzyon iskemi sırasında serbest radikaller oluşmakta ve bu serbest radikaller böbrek tubüler hücrelerde hasara neden olmaktadırlar (Kren ve Walterova 2005).

Serbest oksijen radikalleri (SOR) organizmada dokunun yapısal elemanlarını bozarak zararlı etkilere yol açabilir. Birçok organ ve dokuda iskemi-reperfüzyon hasarının etkileri ortaya konularak antioksidan tedavi ile bu etkilerin azaltılabildiği bildirilmiştir (Prillaman ve Turner 1997).

İskemi veya iskemi sonrası reperfüzyona maruz kalan hücre ya da dokularda ciddi zedelenmeler oluşmaktadır. Reperfüzyon döneminde hücre içine moleküler oksijenin girişiyle hızla oluşan serbest oksijen radikalleri, reperfüzyon hasarında sorumlu tutulan faktörlerin başında gelmektedir.

Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir (Akkoç 2008). Direkt yapılan böbrek iskemi reperfüzyonunda meydana gelen nitrik oksid ($NO^{\cdot}$)'in süperoksit ($O_2^{\cdot -}$) radikali ile birleşerek meydana getirdiği peroksinitrit ($ONOO^-$) bu hasarın meydana gelmesinde önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir.

Hipoksi ve iskemi böbreklerde önemli hasarlara neden olmaktadır. Hipoksi ve iskemi sırasında oluşan böbrek hasarının etiyopatogenezine ve önlenmesine yönelik çalışmalar günümüzde devam etmektedir. Hipoksiye bağlı böbrek hasarlarının patogenezinde serbest radikal ve antioksidan enzimlerin rolünün belirlenmesi, antioksidan tedavi denemelerini gündeme getirmiştir (Sahna ve ark 2003, Sahna ve ark 2004).

Renal İ/R'nin patofizyolojisi eş zamanlı olarak endotel hücre hasarı, tubüler nekroz, tubüler apoptozisle (Linkermann ve ark 2012), inflamasyon ve tubüler hücre proliferasyonu ile ilgili karmaşık bir durumdur (Bonventre ve ark 2011). Birçok araştırma apoptozis yoluyla hücre ölümüne renal İ/R'nin patofizyolojisinin önemli derecede katkıda bulunduğunu rapor etmiştir (Bonegio ve Lieberthal 2002).

1.4. Serbest Oksijen Radikalleri ve Oluşum Mekanizmaları

İ/R hasarı oluşumunda, indirgenme reaksiyonları sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) primer rol oynar (Halliwell ve Gutteridge 1992). SOR kimyasal olarak reaktif moleküllerdir; termodinamik stabiliteyi sağlamak için komşu elektronları veya hidrojen atomlarını ayırmaları gerekir ve bunun sonucunda bu moleküller stabilitesini kaybeder ve bu reaksiyon kısır döngüye girer (Moslen 1994). Bu reaksiyon sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$), perhidroksil radikali (HO_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oldukça reaktif hidroksil radikali ($\cdot OH$) oluşur. Hidroksil radikali özellikle protein, polisakkarit, aminoasit, DNA bazları, uzun zincirli doymamış yağ

asitleri ve organik asitler gibi moleküllerle reaksiyona girer (Moslen 1994, Li ve ark 1996).

SOR oluşumunda elektron transport zinciri, enzimatik tepkimeler (ksantin oksidaz, $NO^{\cdot}$ yolu, eikasonoid metabolizması), enzimatik olmayan tepkimeler (Haber-Weis ve Fenton reaksiyonları, katekolaminler), dış etkenler (radyasyon, toksik kimyasallar, hava kirliliği, antibiyotikler, sigara, alkol) önemli rol oynar. Ksantin oksidaz aracılığıyla radikal üretimi de oldukça önemli bir kaynaktır (Tamer ve ark 2000). Organın tekrar normal metabolik fonksiyonlarının devamı için reperfüzyona ihtiyaç duyulmasına rağmen oksijenin tekrar iskemik bölgeye girmesi sonucu oluşan radikaller reperfüzyon hasarına neden olur. Radikallerin oluşumu iskemi sırasında özellikle hipoksantin-ksantin yolu ile oluşur ve adenin nükleotidleri birikir. Anoksik durumda nikotinadenindinükleotid (NAD) kullanan ksantin dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaza döner ve oksijen radikalleri oluşur. Ksantin oksidaz elektron alıcısı olarak O_2 kullanarak hipoksantin ve ksantini ürik asite çevirir. Bu sırada süperoksit anyonu oluşur. Bunlardan doku hasarına neden olacak oksijen radikalleri veya süperoksit radikalleri demir ve bakır serbest radikallerine çevrilebilir ve bu da hasarı arttırır (Halliwell ve Gutteridge 1992, Moslen 1994, Kumar ve ark 1995, Li ve ark 1996, Saray ve ark 1999, Tamer ve ark 2000).

Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Atmosferin %21'ini teşkil eden oksijenin aerobik organizmanın yaşamı için gerekliliği kaçınılmazdır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkiler önlenir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (Reiter 1995).

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı söz konusudur. Hücresel koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikaller üretilmektedir. Serbest radikal kaynaklarını biyolojik ve hücresel olmak üzere iki başlık altında toplayabiliriz.

1.4.1. Biyolojik kaynaklar:

a. Aktive olmuş fagositler,
b. Antineoplastikler (Nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin, adriamisin) ve ekzojen kimyasalların enzimatik yıkımı,
c. Radyant enerjinin emilimi (Ultraviole, X ışını),
d. Alkol ve uyuşturucular,
e. Çevresel etkenler (Hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler, pestisid, sigara dumanı, solventler, anestezikler ve aromatik hidrokarbonlar),
f. Stres (Streste katekolaminler artar. Artan katekolaminlerin oksidasyonu sonucu serbest radikaller meydana gelir) (Akpolat 2000).

1.4.2. Hücresel kaynaklar:

a. Normal metabolik olaylarda görülen oksidasyon-redüksiyon (redoks) reaksiyonları sırasında (Askorbat, thioller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavin, tetrahidropterin ve antibiotikler),
b. Enzim ve proteinler (Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz ve hemoglobin gibi),
c. Mitokondrial elektron transport zinciri,
d. Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron taşıma sistemleri (sitokrom p450, sitokrom b5 redüktaz),
e. Peroksizomlar (Oksidazlar ve flavoproteinler),
f. Plazma membranı (Lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde dihidro nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz ve lipid peroksidasyonu),
g. Oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma ve intoksikasyon).

Ayrıca değerlilikleri değiştiği için geçiş metalleri denilen bazı metaller, hücre içi reaksiyonlar ya da Fenton reaksiyonu sırasında yeri geldiğinde serbest elektronları alarak veya vererek serbest radikal oluşumunu katalizler.

1.5. Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül

stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir (Acworth ve Bailey 1997, Halliwell ve Gutteridge 1999).

Serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun organ ve dokularda meydana getirdiği hasar ve hastalıkların patogenezindeki rolleri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Yaşlanma, dejeneratif hastalıklar, yanıklar, akciğer hastalıkları, karsinogenez, diabet, ateroskleroz ve katarakt oluşumundaki etkileri birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Seven ve Candan 1995).

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

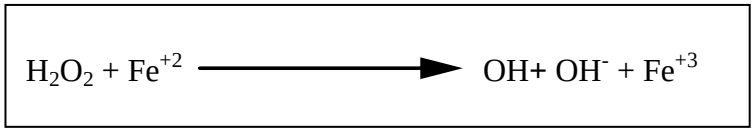
1. Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot -}$),
2. Hidroperoksil radikali (HO_2),
3. Hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$),
4. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$),
5. Singlet oksijen ($^1O_2$).

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir (Davies ve ark 1995).

$$O_2 \xrightarrow{e} O_2^{\cdot -}$$

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

H_2O_2 ise metal iyonları varlığında Fenton Reaksiyonu ile oldukça toksik hidroksil radikaline döner.

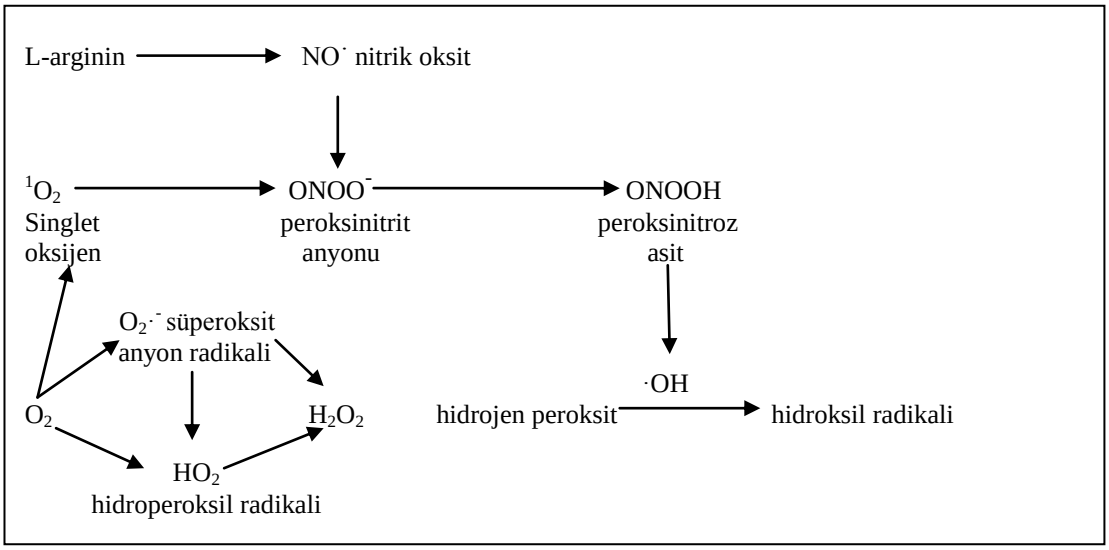


Şekil 1.6. Fenton reaksiyonu (Cuzzocrea ve Reiter 2001).

Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir; ilk karşılaştığı molekül ile 10^{-6} s içinde, 14 Å mesafesinde reaksiyona girer. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur (Şekil 1.7.). Makromoleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulunduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir. İn vivo herhangi bir ·OH radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle ·OH radikalinin oluşumunun önlenmesi, bu radikalin süpürülmesinden daha etkilidir (Reiter ve ark 2001a).

Hidrojen peroksitin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir;

1. Hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür.
2. Hidrojen peroksit, geçiş metallerin varlığında toksik ·OH radikaline dönüşür (Fenton reaksiyonu) (Özel 2006).



Şekil 1.7. Oksijen paradoksu: Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve nitrik oksitle ilişkisi (Reiter 1995).

Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksid ($NO^{\cdot}$), aktive nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranıdır.

1.5.1. Oksijen

Moleküler oksijen dış orbitallerinde paylaşılmamış iki elektron içerir. Bu elektronlar, dönüşleri aynı yönde ve farklı yörüngelerde iken minimum enerji seviyesindedirler. Radikal tanımına göre oksijen diradikal yapıya sahip bir moleküldür. Diradikal yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekülle tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya sahip olması gereklidir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere, atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu oksijenin diğer moleküllere olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama spin kısıtlaması olarak adlandırılır (Kılınç ve Kılınç 2002).

Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar geçiş elementleri sınıfından

bazı metal iyonlarından yararlanırlar. Geçiş elementlerinden demir, bakır, manganez, çinko, kobalt ve molibden vücudun gereksinim duyduğu başlıca eser elementler olup, bu elementler dış orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içerirler. Canlılarda oksijeni kullanan enzimler ya da oksijenle etkileşime giren proteinler, bu elementlerden en az bir tanesini içermek zorundadırlar (Kılınç ve Kılınç 2002). Endojen SOR, enzimatik tepkimeler, enzimatik olmayan tepkimeler ve mitokondriyal elektron transportu sürecinde oluşabilir.

1.5.2. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulum, sitokrom p450 ve sitokrom b5 enzim sistemleri aracılığı ile yağ asitleri ve ksenobiyotiklerin oksidasyonunu gerçekleştirirken serbest radikalleri oluşturabilir (Akkoç 2008).

1.5.3. Peroksizomlar

Peroksizomlar, D-aminoasid oksidaz, ürat oksidaz, Açil Koenzim A oksidaz gibi enzimleri içerdiğinden önemli bir hidrojen peroksit kaynağıdır (Akkoç 2008).

1.5.4. Plazma Membranları

Hücre mebranında siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri ile prostaglandin ve lökotrienlerin oluşumu sırasında hidrosi ve peroksi radikalleri açığa çıkabilmektedir (Barber ve Harris 1994).

1.6. Serbest Oksijen Radikallerin Hücresel Etkileri

Serbest radikaller, dış yörüngesinde tek, paylaşılmamış elektron taşıyan kimyasal ürünlerdir. Bu dengesiz durumun yarattığı enerji, organizmanın temel yapı taşları olan proteinler, karbohidratlar, lipidler ile inorganik kimyasallar gibi komşu moleküllerle olan tepkimeler sonucu açığa çıkar. Serbest radikaller, hücre membranları ve nükleik asidlerin yapısında yer alan anahtar moleküllerdir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen bileşikleri **(**Akpolat 2000, Cuzzocrea ve Reiter 2001, Taşkıran 2002, Türkyılmaz 2003**).**

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

Serbest radikaller hücredeki lipid, DNA, hücre membranı ve proteinlere saldırarak zarara uğratırlar.

1.6.1. Membran Lipidleri ve Lipid Peroksidasyonu

Hücre membranındaki yağ asitleri, fosfolipidler, glikolipidler ve steroller serbest radikallerin en genel hedefleri arasındadır. Hücre membranı hücre dışında oluşan serbest radikaller için hedef noktasıdır. Bu radikaller hücre membranında bulunan proteinler ve lipidleri oksidasyona uğratarak membran akışkanlığının ve iyonik gradiyentin bozulmasına neden olurlar. Bu oksidasyon tepkimesi hidroksil, hidroperoksil ve tekil oksijen radikalleri tarafından gerçekleştirilir (White ve ark 1993, İşlekel ve ark 2000).

1.6.2. Nükleik Asitler ve DNA

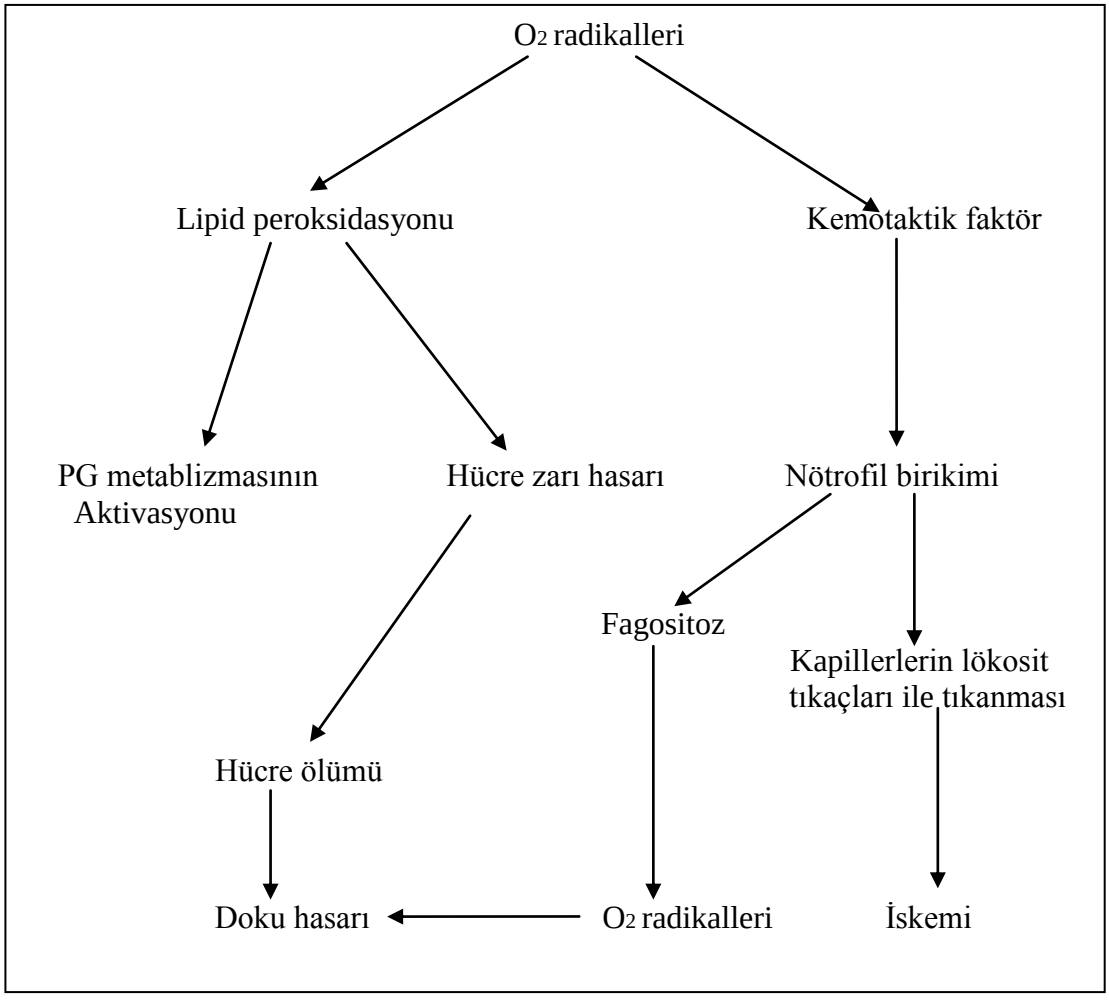
Nükleik asitler serbest radikaller için önemli hedeflerden biridir. Serbest radikallerle nükleotidlerin etkileşmesi sonucu DNA zincirinde kırılma ve mutasyonlar oluşabilir. DNA hasarının büyüklüğü serbest radikallerin polimeraz enzimi ile reaksiyona girerek DNA'nın onarılmasını engellemesi ile ilişkilidir (Ateş 2001).

1.6.3. Proteinler

Serbest radikaller protein yapısındaki amino asitlerle reaksiyona girerek sülfidril gruplarının kaybına ve karbonil gruplarının oluşmasına neden olurlar. Özellikle yapısında çift bağ ve sülfidril grubu içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin ve sistein serbest radikallerle reaksiyona girerler (Kehrer 1993).

1.6.4. Karbonhidratlar

Hidroksil radikali glukoz, mannitol ve deoksi şekerlerle doğrudan reaksiyona girer. Monosakkaritlerin oksidasyonuyla peroksitler, hidrojen peroksit ve okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağlar yapma özelliğinden dolayı hücrede zararlı etkilere yol açarlar (Ateş 2001).



Şekil 1.8. Serbest oksijen radikallerinin etkileri (Schoenberg ve Beger 1993).

1.7. Serbest Radikallerin Hasar Mekanizması

Reperfüzyon döneminde oluşan serbest radikallere bağlı olarak, hücrenin temel yapı ve fonksiyonlarında değişik derecelerde hasar oluşmaktadır. Bu hasara en fazla duyarlı olan yapılar membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve DNA molekülleridir (Reilly ve ark 1991).

Serbest radikaller bütün hücresel makromoleküllerle reaksiyona girebilirler. Hücresel hasar oluşumunda özellikle üç tip reaksiyon önemlidir.

1.7.1. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu

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

Hücrenin protein yapıları, serbest radikallerin özellikle duyarlı amino asidler ile direkt/doğrudan etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu bulunduran aminoasidler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik aminoasidler, oksidasyona en fazla maruz kalan moleküllerdir. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir.

Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır (İşlekel ve ark 2000).

1.7.2. DNA hasarı

Serbest oksijen radikalleri, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tipte hücre oluşumu olur (Özel 2006).

Reaktif oksijen radikallerinin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makromolekül nükleik asidlerdir. DNA'nın temel yapı taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (Kilgore ve Lucchesi 1993, İşlekel ve ark 2000).

1.7.3. Lipid Peroksidasyonu

Serbest oksijen radikalleri, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Hidroksil radikali membran lipidleri ile çift bağ yapar ve böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (malondialdehit, dien konjugatları gibi) oluşur. Eritrosit membranlarının, lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması ile bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar. Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin plazma ve organel membranları üzerinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur (White ve ark 1993, İşlekel ve ark 2000).

Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asidleri, oksijen ve metal katalizörler bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlanması bakımından çok uygundur. Lipid radikalleri veya malondialdehid gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı ve fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır. Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında akışkanlığın azalması, membran geçirgenliğinin değişmesi, membran potansiyeli azalması, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde azalma gözlenir.

Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin hücre içine salınması sonucunda proteoliz hızlanır ve doku hasarı şiddetlenir. Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan potasyum ve magnezyum iyonlarının konsantrasyonları

değişir ve buna bağlı olarak protein sentezinde inhibisyon gerçekleşir (White ve ark 1993, İşlekel ve ark 2000).

Serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal olaydır. Böylelikle membran lipid yapısı değişir, hücre yapı ve fonksiyonları bozulur. Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşir: Başlangıç, zincir gelişimi ve sonlanma. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalin, zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki α-metilen gruplarından hidrojen atomunu uzaklaştırmasıyla başlar. Burada asıl etkili radikalin hidroksil radikali olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Lipid radikalinin moleküler oksijenle reaksiyona girmesiyle lipid peroksid radikalleri meydana gelmektedir. Lipid peroksid radikalleri de zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asidlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşmektedir (Şekil 1.9.) (Söyük 2001).

Başlangıç	I. + LH ⟶ IL + L.
Zincir gelişimi	L. + O2 ⟶ LOO.
	LOO. + LH ⟶ L. + LOOH
Sonlanma	LOO. + LOO ⟶ LOOOOL
	LOOOOL ⟶ Radikal olmayan ürünler, O2

I.: Başlangıç radikali, L.: Lipid radikali, LOO.:Peroksil radikali, LH: Lipid molekülü

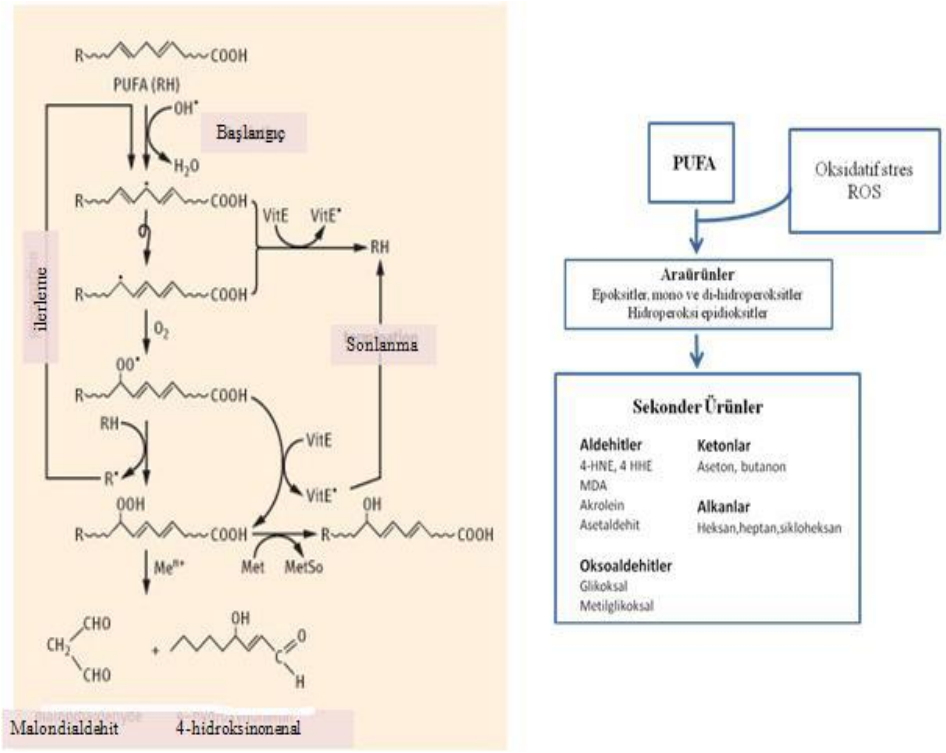
Şekil 1.9. Lipid peroksidasyonu (Söyük 2001).

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehid ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehid (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asid testiyle ölçülmekte ve yöntem lipid peroksid düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. MDA proteinlerin aminogruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asidlere bağlanarak toksik etkisini gösterir (Söyük 2001).

İ/R hasarındaki en büyük hasar lipid peroksidasyonu ile gerçekleşir. Lipid peroksidasyonu kuvvetli bir radikal olan hidroksil radikali etkisi ile zar yapısındaki

fosfolipidlerde mevcut olan poliansature yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından (PUFA) (örneğin arasidonik asit veya linolenik asit) bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlar ve yağ asidi zinciri radikal niteliği kazanır. Lipid radikalleri dayanıksız olup bir takım değişikliğe uğrar. Başta molekül içi çift bağ aktarımı ile dien konjugatları oluşmaktadır. Oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksit radikali (LOO) oluşur. Bu LOO radikali zardaki diğer poliansature yağ asidini etkileyerek yeni radikaller oluşturup kendisi aldığı hidrojen atomu ile lipid hidroperoksitlerine dönüşür. Lipid peroksidasyonu lipid hidroperoksitlerinin malondialdehit (MDA) ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona erer (Tamer ve ark 2000). Zar yapısı bozulduğu için geçirgenlik artar, transmembran proteinlerinde hasar oluşturur (Tamer ve ark 2000). Lipid membranın destrüksiyonu hücrede iyon ve enzim dengesizliğine neden olur. Bu da Ca^{+2} akımına, hücre ödemi ve nekroza yol açar. Lipit peroksidasyonu ROS aracılı hücre hasarının en önemli sonuçlarından biridir. Fizyolojik şartlar altında düşük hızda gerçekleşen lipit peroksidasyonunun oksidanlar ve oksidatif stres ile oluşum hızı artabilmektedir. Lipit peroksidasyonunun en önemli hedefi çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriği fazla olan membran fosfolipitleridir. PUFA'lar ve metabolitleri enerjinin sağlanması, hücre içi sinyal oluşumu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi önemli fizyolojik rollere sahiptir. Bu nedenle lipit peroksidasyonu membran lipit tabakasının fizyolojik yapısını değiştirerek hücresel işlev kaybına neden olabilmektedir.

Peroksidasyon 4-hidroksinonenal (4-HNE), malondialdehit (MDA), akrolein, glikoksal gibi oldukça toksik aldehit yapıda ürünlerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Şekil 1.11.). Bu aldehitler çok düşük veya nontoksik derişimlerde sinyal oluşumu, gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu gibi önemli hücre fonksiyonlarını düzenleyici etki gösterebilmektedir. Buna karşın yüksek derişimlerde hücresel proteinlerle reaksiyona girerek protein işlev bozukluğuna ve hücresel yanıtta değişime neden olabilmektedir. Yaygın olarak tanımlanmış toksik aldehitlerden biri MDA olup, araşidonik asit, eikozapentaenoik asit ve deksohekzaenoik asit peroksidasyonu sırasında oluşmaktadır. MDA, lizin residüleri ile etkileşerek düşük dansiteli lipoprotein (LDL) modifikasyonunda önemli rol oynamakta olup, DNA ile etkileşimi sonrası mutasyonlara neden olabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Delrio ve ark 2005, Negre-Salvayre ve ark 2008, Catala 2009).



Şekil 1.10. Lipit peroksidasyonu ve ürünleri (Murat 2010).

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

Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidayonu, kuvvetli bir radikal olan hidroksil radikali etkisi ile zar yapısında bulunan fosfolipidlerde bulunan araşidonik asit veya linoleik asit gibi çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunu uzaklaştırması ile başlar. Bu oluşan yağ asidi zinciri serbest radikal özelliği kazanır. Oluşan bu radikal lipid zinciri oldukça dayanıksız olup bir dizi değişikliliğe uğrar. İlk olarak molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatlar oluşur. Daha sonra, lipid radikallerinin moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi

sonucu lipid peroksit radikali (LOOH) oluşur. Bu oluşan radikal de zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asidini etkileyerek yeni lipid radikalini oluşturarak ve kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşmektedir. Böylece reaksiyonun oto katalitik bir sürece girmesi sağlanmaktadır. Lipid peroksidasyonu lipid hidroperoksitlerinin malondialdehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona ermektedir. Biyolojik membranlarda oluşan lipid peroksidasyonu membranların iyonlara karşı geçirgenligini artırır ve membran reseptörü enzim gibi transmembran proteinlerinin hasarlarına yol açar. Bakır ve çinko gibi geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Liebert ve ark 2005).

Serbest oksijen radikallerinin; savunma sisteminin koruyucu etkisini aşacak şekilde fazla oluşmaları sonucu, metabolizmada zararlı etkiler oluşturur. SOR'den en yüksek oranda etkilenen bileşik lipidlerdir. Membranlarda bulunan fosfolipidlerdeki doymamış bağlar ve kolesterol, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek, peroksidasyon ürünlerini meydana getirir. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehittir (Ernster 1988, Foschi ve ark 1993, Carecani ev ark 1994). Oluşan malondialdehit; hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek, membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Malondialdehit bu özelliğinden dolayı, DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebilir. Bundan dolayı da malondialdehit mutajenik, kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Porter 1984, Niki 1987).

1.8. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Doğal Savunma Mekanizmaları

Serbest oksijen radikallerinin ciddi hasar yapma potansiyellerine karşı hücreler, bu toksik ürünleri hızla metabolize edecek savunmaları geliştirmişlerdir. Süperoksite karşı savunmanın ilk hattında süperoksid dismutaz enzimi yer alır. Süperoksitin, hidrojenperoksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder. Sitozolde bulunan formu bakır, mitokondride ki formu ise manganez içerir.

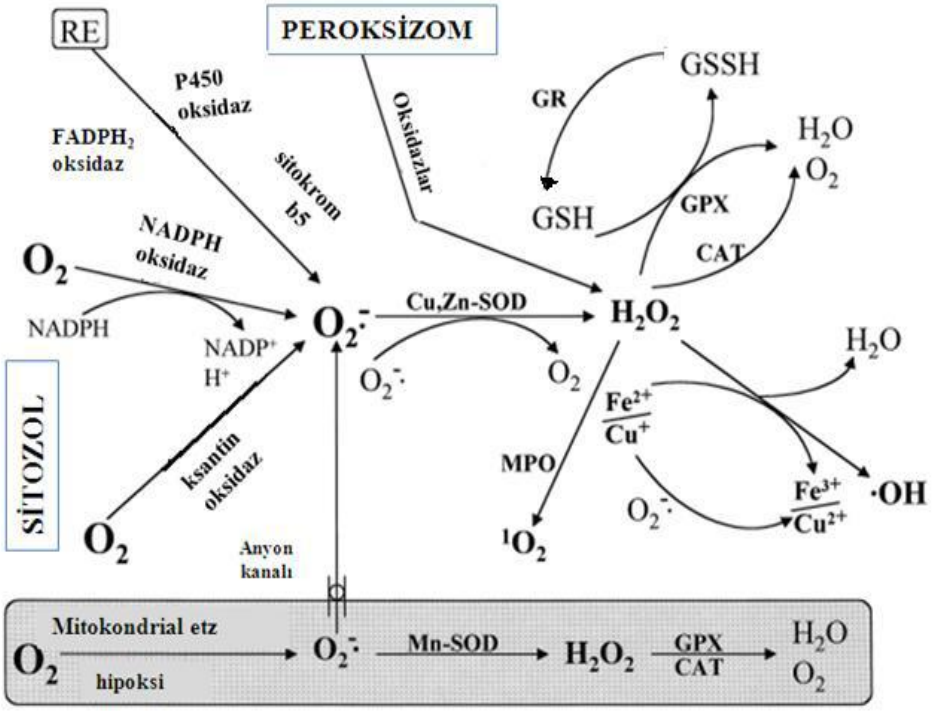
Peroksizomlarda bulunan H_2O_2 yine aynı organelde bulunan katalaz enzimi tarafından metabolize edilir. Sitozolde ve mitokondrilerde bulunan H_2O_2 metabolizmasında rol alan bir diğer enzim glutatyon peroksidazdır. Savunmanın bu

ikinci hattındaki bir diğer yöntem Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşumunu engellemek amacıyla redoks aktif metallerin (bakır, demir gibi) transport ve depo proteinlerine bağlanarak ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Demirin transferine bağlanarak taşınması veya ferritine bağlanarak depo edilmesi buna örnek verilebilir.

Serbest radikallerin lipidlerle oluşturduğu zincirleme reaksiyonların durdurulması da bir diğer savunma yöntemidir. Bu reaksiyonları A ve E vitamini gibi antioksidanlar yapar (Özel 2006).

1.8.1. Oksidan ve Antioksidan Mekanizmalar

Organizmada gerçekleşen çeşitli tepkimelerde reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan yüksek oksitleme yetisine sahip moleküller üretilmektedir. ROS düşük derişimlerde hücresel sinyal sistemlerinde fonksiyon gösterirken, yüksek derişimlerde nükleik asit, lipit ve protein hasarına neden olmaktadır. Bu oksidan moleküllerin etkilerine karşı organizma antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. ROS ve antioksidan mekanizmalar fizyolojik şartlarda denge halinde bulunmaktadır (Şekil 1.11.). ROS oluşumundaki artış ve/veya antioksidan mekanizmalarda azalma bu dengeyi bozarak oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres, kanser, diyabet, ateroskleroz, inflamatuar hastalıklar ve nörodejenerasyon gibi pek çok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (Valko ve ark 2006, Yu ve ark 2006).



Şekil 1.11. Reaktif oksijen moleküllerinin oluşumu ve endojen antioksidanlar (Murat 2010).

Organizmanın pro-oksidan/antioksidan dengesi sağlıklı bir yaşam sürdürebilmek için çok önemlidir. Hücrede serbest radikalleri uzaklaştırmak için çok sayıda antioksidan savunma mekanizması mevcuttur. SOR'ların oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan "antioksidan savunma sistemi" beş yolla etki göstermektedir:

a. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, "süpürücü etki". Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu yolla etki gösterirler (Reiter 1995, Karihtala ve Soini 2007).
b. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya "inaktif şekle dönüştürücü etki". Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler (Cherubini 2008).
c. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki "zincir kırıcı etki"dir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller "zincir kırıcı etki" gösterirler (Mickle ve Weisel 1993).

d. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde "onarıcı etki" gösterirler (Virág ve Szabó 2002).
e. "Antioksidan kapasiteyi artırıcı etki" (Taşkıran 2002).

Antioksidan bileşiklerin bir kısmı birkaç mekanizmayı birden kullanarak etkilerini göstermektedir. Toksik oksidanların oluşumunun önlenmesi için; organizmada oksidatif stres yapıcı nedenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi, bunlardan uzak durulması ve etkileriyle mücadele edilmesi ilk yapılması gerekenler olarak sıralanabilir (Taşkıran 2002).

Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olan antioksidanların tanımlanmasında ve etkinliklerinin ortaya konmasında İ/R hasarı modelleri önemli katkı sağlamıştır. Antioksidan özelliği öne sürülmüş pek çok madde çeşitli İ/R modellerinde test edilerek değerlendirilmiştir. Glutatyon peroksidaz gibi enzimler serbest radikallere karşı koruyucudur. Peroksizomlarda bulunan katalaz hidrojen peroksidi enzimatik olarak parçalar. Ayrıca sistein, glutatyon, seruloplazmin gibi sülfidriller ile A, C ve E vitaminleri serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ya da onları inaktive eden endojen ve eksojen antioksidanlardandır (Çizelge 1.2.) (Cadenas 1995, Steenvoorden ve Henegouwen 1997, Mitchell 2000, Ateş 2001, Taşkıran 2002, Türkyılmaz 2003).

Endojen antioksidanlar

a.Enzim olan endojen antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx), glutatyon S-Transferaz (GST), katalaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz (Valko ve ark 2007).
b.Enzim olmayan endojen antioksidanlar; melatonin, seruloplazmin, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albümin (Şehirli 2001).

Eksojen antioksidanlar
a. Vitamin eksojen antioksidanlar: a-tokoferol (vitamin E), β-karoten, askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat).

b. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar;

- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten),
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar),
- Rekombinant süperoksit dismutaz,
- Trolox-C (vitamin E analoğu),
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein),
- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin),
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin),
- Nötrofil adezyon inhibitörleri,
- Sitokinler (TNF ve IL-1),
- Barbitüratlar,
- Demir şelatörleri (Akkuş 1995).

Çizelge 1.2. Başlıca antioksidanlar (Taşkıran 2002, Türkyılmaz 2003).

ENZİMLER	YAĞDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULAR
Süperoksid dismutaz Katalaz Glutatyon peroksidaz Glutatyon redüktaz Glutatyon transferaz Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz Sitokrom oksidaz	E vitamini ß-karoten Bilirübin Ubiquinol Flavonoidler Melatonin
SUDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULAR	METAL İYONLARI BAĞLAYAN PROTEİNLER
İndirgenmiş glutatyon C vitamini (Askorbik asid) Ürik asit Glukoz Sistein Mukus Taurin Sisteamin	Ferritin Transferrin Haptoglobin Hemopeksin Seruloplazmin Albumin Laktoferrin

1.8.2. Glutatyon (GSH)

Glutatyon peroksidazın reaksiyonu esnasında oluşan okside glutatyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) dönüştürerek dolaylı olarak antioksidan etki gösteren bir enzimdir. Bu katalizi gerçekleştirirken koenzim olarak NADPH kullanır (Kondoh ve ark 2003).

GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki de en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir (Lu 2009). Sentezde γ-glutamil sistein sentaz ve GSH sentaz enzimleri katalizördür. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korur, böylece fonksiyonel proteinlerin

ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. GSH yabancı bileşiklerin detoksifikasyonu ve amino asitlerin membranlardan transportunu da sağlar. GSH eritrositleri, lökositleri ve göz merceğini oksidatif strese karşı korumada hayati öneme sahiptir (Reiter ve ark 1995).

GSH homeostazı için diyette yeterli protein alınmasının gerekli olduğu ve enteral veya parenteral alınan sistin, metiyonin ve N-asetilsistein'in GSH biyosentezinde sisteinin prekürsörü olarak önemli rol oynadığı çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (Qaisiya ve ark 2014). Yaşamsal fonksiyonlarda öneme sahip GSH'nın hayvan çalışmalarında yeterli konsantrasyonlarda lenfositlerin ve ince barsak epitel hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğu belirtilmiştir. Spermatogenez ve sperm olgunlaşmasında önemli rol oynadığı, influenza enfeksiyonunu inhibe ettiği, T-lenfositlerin, PMNL'lerin ve sitokinlerin aktivasyonu için gerekli olduğu ve immün sistemin önemli bir elemanı olarak fonksiyon gösterdiği ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalar GSH eksikliğinin oksidatif strese yol açtığını ve Alzheimer, parkinson, epilepsi, karaciğer hastalıkları, kistik fibrozis, orak hücreli anemi, AIDS, kanser, koroner kalp hastalığı, inme, diyabet gibi pek çok hastalığın nedeni olabileceğini ortaya koymaktadır (Ross 1988).

GSH hücre içi antioksidan sisteminin bir üyesi olup, hücre redoks dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Peroksitleri, daha az zararlı olan yağ asitlerine, su ve GSH disülfidlerine dönüştürür. Antioksidan işlevinin yanı sıra sinyal iletiminin modülasyonu, hücre proliferasyonu ve immün cevapta da işlevleri tanımlanmıştır (Patel ve Gores 1995, Terada ve Nakanuma 1995, Dickinson 2002, Ault ve Lawrence 2003, Jaeschke 2003).

GSH bunların dışında;

1. DNA' nın deoksiribonükleotid öncüllerinin sentezinde görev alır.
2. Esansiyel–SH grupları içeren enzimlerin koruyucusu ve aktivatörü olarak görev yapar.
3. GSH-peroksidaz gibi antioksidan enzimler için kofaktör olarak çalışır.
4. Hücre için toksik olan sisteini depo eder.
5. Hücre içi bakır taşınımı ve detoksifikasyonda görev yapar.

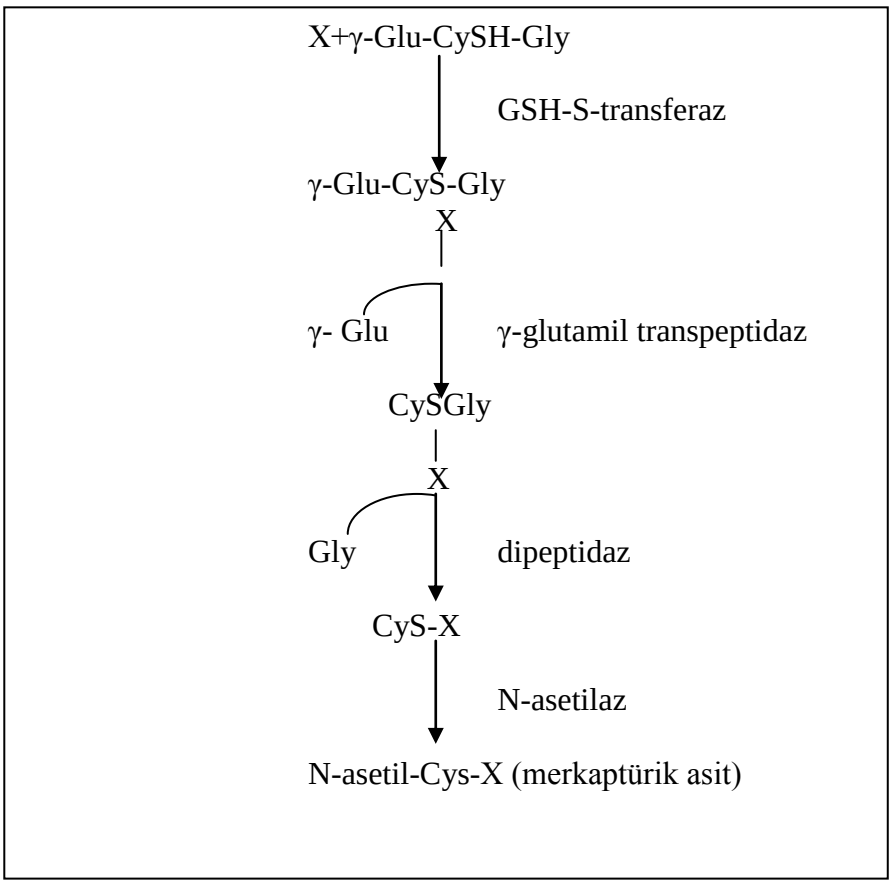
Hücre içi GSH derişimi, GSH'nın hücrede kullanım sentez hızına bağlıdır. Özellikle savunma sisteminde GSH kullanımı, hücre GSH/GSSG oranının düşmesine sebep olmaktadır. Oksidatif stres hücrede GSSG ve protein karışık disülfit derişimlerinin artmasıyla sonuçlanır. GSH hücre içerisinde özellikle hidrojen peroksit (H_2O_2) detoksifikasyonu (glutathion peroksidaz aracılı) sırasında oksitlenmektedir. Oksidasyona uğrayan tiyollerin indirgenmesi ya da olası ise denovo biyosentez ile geri kazanımı NADPH bağımlı glutathion redüktaz, thiyol transferaz (TRX) ve glutaredoksin redüktaz (GRX) enzimleri tarafından sağlanır. GSSG ve protein tiyolleri ile karışık disülfitler bu enzim sistemleri tarafından GSH'a çevrilir (Patel ve Gores 1995, Ronen ve Esther 2002, Bayramiçli 2005).

GSH'nın çeşitli moleküllerle konjugasyonu, hücre GSH derişiminin düşmesi nedenleri arasında yer almaktadır. GSH'nın küçük moleküllerle oluşturduğu bu konjugatlar hücreden atılır. Konjugasyon veya atılım nedeni ile olan GSH miktarındaki azalma, hepatositlerde biyosentez ile ya da eksojen GSH alınımı ile karşılanır. Hücre içi GSH'nın düşmesi erken dönemde hücrede adaptif yanıt oluşturarak GSH biyosentezini arttırmaktadır (Terada ve Nakanuma 1995, Ronen ve Esther 2002, Jaeschke 2003).

Yüksek GSH derişimi hücre fonksiyon ve canlılığının bir göstergesi olarak kabul edilir (Ballotori ve ark 2005). Bunun aksine GSH derişiminin düşmesi hücre içi savunma sisteminin zayıflamasının ve mitokondriyal hasarın belirteçlerinden birisi olarak kabul edilir (Shaw 1997). Mitokondriyal ve sitoplazmik glutathionun tüketilmesi, apoptotik hücre ölümünün erken sinyalini oluşturur. GSH'daki azalma mitokondri transmembran potansiyelini değiştirmekte, bu da mitokondrinin hızlı bir şekilde fonksiyonunu kaybederek, sitokrom C'nin sitoplazmaya salınımına sebep olmaktadır. Böylece apoptozise giden yol tetiklenmektedir (Bayramiçli 2005) .

Glutatyon, redükte glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) olmak üzere iki formda bulunmaktadır. Redükte olan form hücrede baskın olan formdur. Hücre glutatyonunun %80-85'i sitozolde, % 10-15'i mitokondride ve çok az bir kısmı endoplazmik retikulumda bulunmaktadır. Mitokondrial GSH hücre için esansiyeldir. Glutatyon sentezi için gerekli enzimler mitokondride bulunmadığı için mitokondri GSH'ı sitozolden sağlanmaktadır. Glutatyon transport kapasitesine sahip iki antiport

taşıyıcı protein tanımlanmıştır. Bunlar dikarboksilat taşıyıcı protein ve 2-oksoglutarat taşıyıcı protein'dir (Valko ve ark 2006, Yuan ve Kaplowitz 2009).

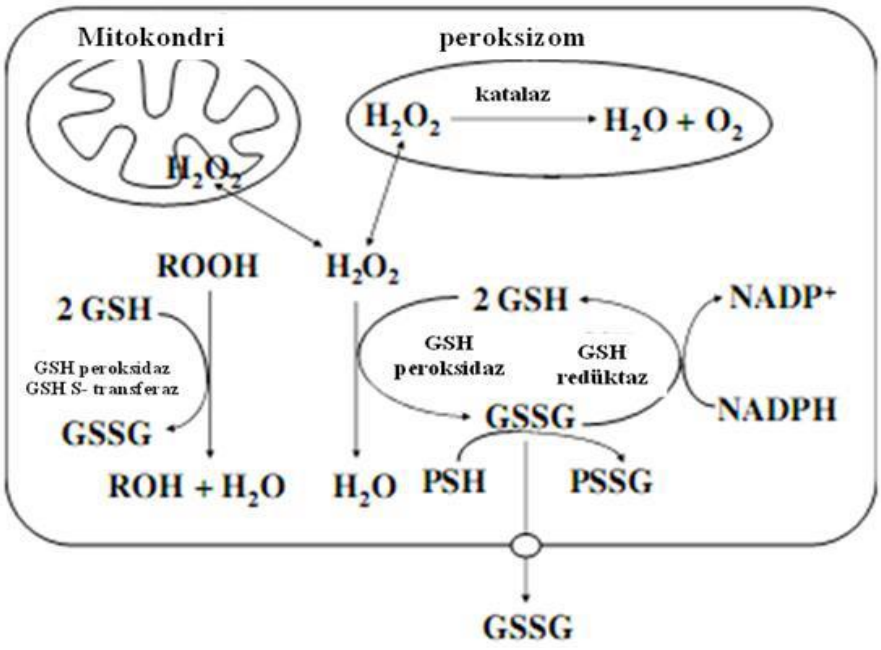


Şekil 1.12. GSH aracılı detoksifikasyon mekanizması (Lu 2009).

Glutatyon protein olmayan tek tiyoldür ve hücre içi tiyol dengesinin, redoks durumunun ana belirleyicisidir. Ayrıca GSH/GSSG, NADP+/NADPH ve tiyoredoksin (TrxSS/Trx(SH)2) gibi çiftler hücre içinde redoks ortamın sağlanmasına yardımcı olmaktadır. GSH derişimi diğerlerine göre 100-10000 kat daha fazla olduğu için redoks durumunun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. GSH derişiminin yanında GSH/GSSG molar oranı da redoks potansiyelinde belirleyicidir. Orta şiddette bir oksidatif stres sırasında GSH/GSSG oranı değişmeksizin GSH tüketilmekte ve GSSG'nin GSH'a indirgenmesi yolu ile redoks potansiyeli korunmaktadır. Hücre içi GSH havuzu farklı hücrelere göre değişim göstermektedir. Örneğin hepatositte yaklaşık 10 mM iken nöron GSH derişimi yalnızca 1mM'dır. Bu nedenle hepatositin redoks kapasitesi nörona göre daha fazladır. Hücredeki enzimlerin aktiviteleri, sinyal oluşumu gibi birçok işlevin gerçekleşmesi hücre içi

tiyol düzeyine bağlıdır. Tiyol transferazın katalizlediği reaksiyonla GSH ile protein arasında tiyol-disülfit değişimi gerçekleşmektedir.

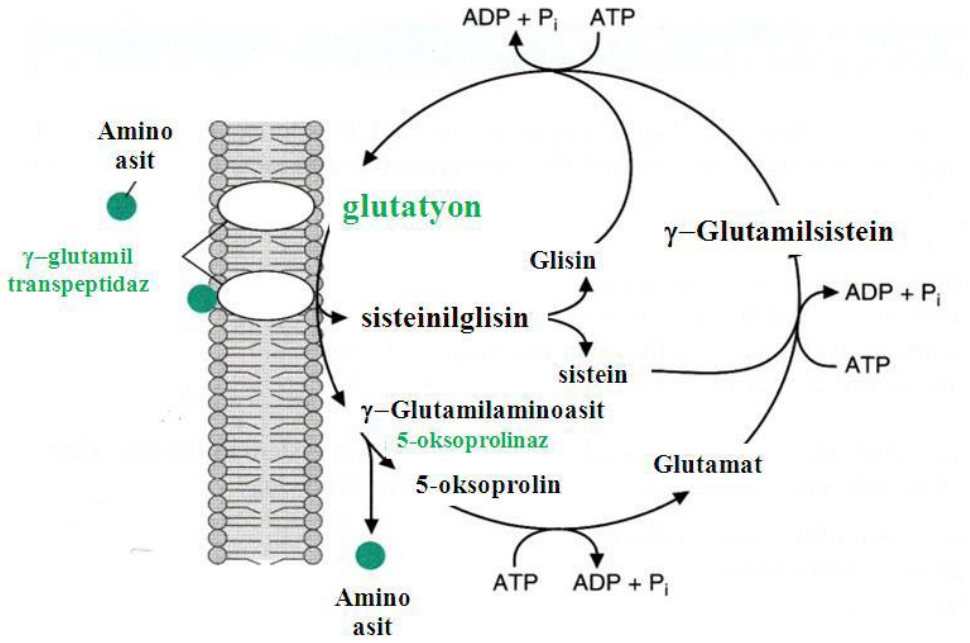
Bu reaksiyon tersinir olup, hücre içi GSH ve GSSG derişimlerine bağlıdır. Fizyolojik şartlarda hücresel GSSG içeriği çok düşük olduğu için protein disülfit oluşumu da sınırlıdır. Şiddetli oksidatif stres sırasında oluşan ROS, lipit peroksidasyonu ve hücre hasarına neden olmaktadır ve oluşan H_2O_2 ve organik peroksitler GSH ile indirgenmektedir. H_2O_2'in indirgenmesinde peroksizomlarda katalaz enzimi işlev görmektedir. Mitokondride katalaz bulunmadığı için mitokondrial oksidatif strese karşı korunmada GSH çok önemli rol oynamaktadır. Şiddetli oksidatif stres durumunda GSH azalırken GSSG derişimi artar. Artan GSSG ya aktif olarak hücreden uzaklaştırılmakta ya da proteinlerin sülfidril gruplarıyla etkileşerek protein disülfit oluşumuna yol açmaktadır (Şekil 1.13.). Şiddetli oksidatif stres hücresel GSH tüketimi ile sonuçlanmaktadır.



Şekil 1.13. GSH'ın antioksidan işlevi (Lu 2009).

Glutatyonun en önemli görevlerinden biri de sistein deposu olmasıdır. Sistein hücre dışı ortamda kararsızdır ve hızlıca sistine okside olmaktadır. GSH'ın sistein kaynağı olarak işlev göstermesi -glutamil döngüsü ile sağlanmaktadır (Şekil 1.14.).

Glutamil döngüsü en fazla böbrekte olmak üzere, karaciğer ve diğer bazı dokularda fonksiyon göstermektedir (Yuan ve Kaplowitz 2009).



Şekil 1.14. Glutamil döngüsü (Yuan ve Kaplowitz 2009).

1.8.3. Çinko ve Antioksidan Özellikleri

Metabolizma için gerekli esansiyel bir eser element olan çinkonun, insan sağlığı bakımından önemini her geçen yıl daha belirgin hale gelmiştir (Prasad ve ark 2004.) Bugün artık çinkonun 300'den fazla enzimatik reaksiyonda ve gen ekspresyonunda rolü olan 2000'den fazla proteinin yapısında bulundugu bilinmektedir 300'den fazla enzimin biyolojik fonksiyonları için gereklidir. Çinko, DNA sentezinde, normal büyümede, beyin ve sinir sisteminin gelişiminde, davranışsal cevapta, üremede, fetal gelişimde, membran stabilitesinde, kemik formasyonunda, yara iyileşmesinde görevli enzimlerin katalizlenmesinde gereklidir (Barceloux 1999, Mocchegiani ve ark 2000).

Çinkonun metabolik olaylarda, protein, karbonhidrat, enerji, nükleik asit, lipit ve hem sentezinde, homeostaziste, gen ekspresyonunda, immün sistem maturasyonunda, doku sentezinde, embriyogenezisde, oksidatif streste, apoptoziste, oksidatif hasarın önlenmesinde yaşlanmada önemli roller üstlendiği birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Arcasoy 2002, Beyersmann 2002).

Oksidan türlerle direkt olarak temasa geçip, bir serbest radikal reaksiyonunu engelleyen bileşikler antioksidan olarak tanımlanmaktadır (Boyunaga ve Çelik 1996). Bu tanıma uymayan çinko; serbest radikal reaksiyonuna direkt olarak engel olmaz ve antioksidan etkilerini indirekt olarak; serbest radikallerden koruyan, sülfidrilden zengin proteinler olan metallotiyoneinlerin yeterli doku konsantrasyonunu koruyarak ve sentezini indükleyerek (Zhou ve ark 2002), ayrıca sülfidril içeren proteinlerin oksidasyonunu engelleyerek (Conte ve ark 1996, Fu ve ark 1996, Klug ve Rhodes 1998), redoks stabil özelliği ile kritik ekstrasellüler bölgelerde demir ve bakır gibi redoks reaktif metallerin yerine geçerek (Cousins 1985, Bray ve Bettger 1990) tioller için koruyucu ajan olarak, serbest radikalleri oluşturan demir ile kimyasal gruplar arasındaki ilişkiyi önleyerek gerçekleştirmektedir.

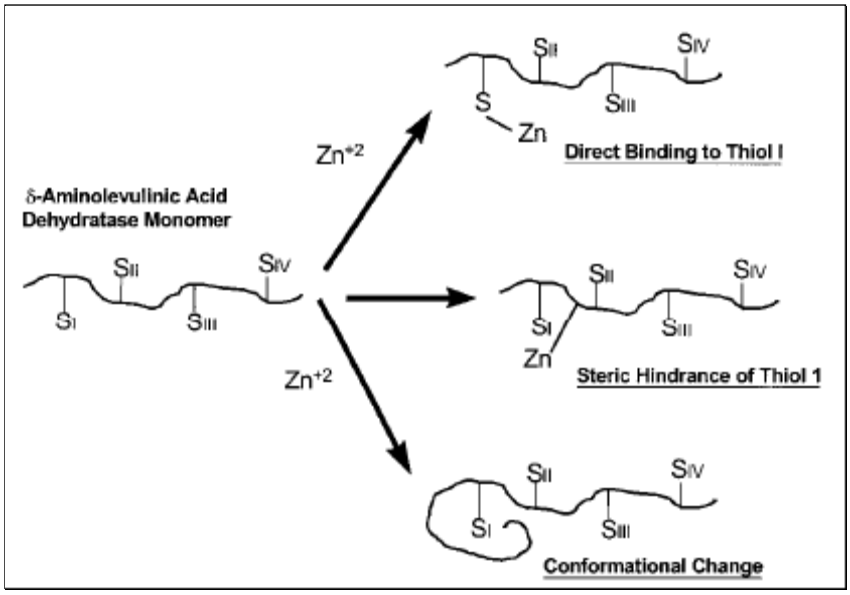
Genel olarak antioksidan mekanizma akut ve kronik etkiler olarak ayrılmaktadır. Kronik etkiler organizmanın uzun dönem çinkoya maruziyeti sonucu metallotionein gibi bazı maddelerin uyarılması sonucu oluşmaktadır. Kronik çinko eksikliği bazı oksidatif streslere duyarlılığı arttırmakla sonuçlanır. Fakat bunun mekanizması halen açık değildir. Birçok çalışmada kronik çinko alımının karaciger, böbrek, bağırsak gibi çesitli organlarda metallotioneinleri uyardığı gösterilmiştir. Metallotioneinlerin antioksidan etkiler göstermesi, hücresel redoks durumu ile hücresel çinko arasında bağlantı sağlaması ile açıklanmıştır. Çinkonun akut antioksidan etkileri, kısa dönemde çinko düzeylerinin artması sonucunda oluşmaktadır. İki temel mekanizma ile açıklanmaktadır.

1. Protein sülfidrillerinin korunması
2. Redoks reaktif geçiş metallerinin antagonizması aracılığı ile süperoksit ve H_2O_2'den $\cdot OH$ oluşumunu indirgemesi.

Çinko koruyucu etkisini, azalmış sülfidril reaktivitesine sekonder olarak sülfidril gruplarını koruyarak göstermektedir. Çinko tarafından korunan sülfidril içeren proteinlere; Dihidrooratаz, çinko parmaklar (DNA çinko-bağlayan proteinler), tübülin, alanil t-RNA sentetaz, E. coli DNA topoizomeraz I, protein farsenil transferaz, Clas I tRNA sentetaz örnek verilebilir (Tapiero ve Tew 2003).

Sülfidril gruplarının stabilizasyonu; sülfidril grubuna direk olarak çinkonun bağlanması, sülfidril grubuna yakın protein üzerindeki bölgelere bağlanması, protein yapısında konformasyonel değişiklik meydana getirmesi ile sağlanabilmektedir (Şekil 1.15.).

Gama-aminolevülinat dehidrataz, sülfidril bağımlıdır ve enzim aktivasyonu ile tiol oksidasyon durumu arasında sağlam bir ilişki vardır. Çinko, gama-aminolevülinat dehidrataz'ı oksijen aracılı inaktivasyondan korur. Böylelikle enzimin tiol oksidasyonunu ve disülfit formasyonunu önlemektedir. Çinkonun ortadan kalkmasıyla sülfidril reaktivasyonu artar ve enzim aktivitesinin kaybı ile sonuçlanır (Gibbs ve ark 1985). Çinko, tiol bağımlı enzimleri ve tiol grupları içeren proteinleri korumaktadır (Powell 2000).



Şekil 1.15. Çinko tarafından gama-aminolevülinat dehidrataz sülfidrillerinin korunma mekanizması (Powell 2000).

Çinkonun, Fenton reaksiyonu aracılığı ile süperoksit ve H_2O_2'den ·OH oluşumunu sağlayan redoks aktif metallerden demir ve bakırın katalitik özelliklerini antagonize eden sistemlerde vardır. Hücre içinde serbest demir; nükleotidler, sitrat, glisin ve glukoz gibi düşük moleküler ağırlıklı ligandlarla birleşme eğilimindeyken, bakır; DNA, karbonhidratlar, enzimler ve proteinler gibi makromoleküler yapılarla kompleks oluşturma eğilimindedir.

Çinko tarafından serbest radikal olusumunun antagonize edilme mekanizmaları:

- Cu ve Fe / askorbat ile uyarılan DNA kırıklarını azaltması,
- Eritrositlerde Fe^{+++} askorbatın uyardığı methemoglobin oluşumunu azaltması,
- $O_2 \cdot^-$, ·OH ve hipoklorit oluşumunu sağlayan sistemleri antagonize etmesi,
- Ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz yoluyla üretilen $O_2 \cdot^-$ ve ·OH oluşumunu,
- Forbol-12-miristat-13-asetat tarafından stimüle edilen lökositlerde O_2 üretimini baskılanması,
- PC-12 hücrelerinden forbol ester tarafından uyarılan laktat dehidrogenaz salınımını azaltması,
- Eritrosit membranlarında ksantin oksidaz aracılı çapraz bağlanma oluşumunu,
- Cu^{++} aracılı kemilüminesansı, benzoat hidroksilasyonu ve askorbat oksidasyonu azaltması şeklindedir (Tapiero ve Tew 2003).

Çinko DNA'nın stabilizasyonu için de önemlidir ve diğer hücre kompartmanlarına göre nükleusta daha uzun süre kalmaktadır. Buna göre, hücre içi çinko düzeyi yükseldiğinde fazla demir nükleoproteinlerden yer değiştirecek ve ·OH türevleri aracılığı ile olan DNA hasarında azalmaya neden olacaktır.

Çinko isoproterenolün uyardığı oksidatif kardiyak hasar üzerine inhibitör etkilidir. Çinkonun μM konsantrasyonlarda iskemik hasarı düzeltmesi, redoks aktif metaller ile ilişkili oksidatif hasarın inhibisyonu ile ilişkilidir (Powell ve ark 1999).

Çinko, membranların ve hücre bileşenlerinin stabilizasyonunda işlevseldir. Karbonhidrat ve lipit gibi makro moleküllerin sentezi ve yıkımı ile ilgili bazı enzimlerin bileşenidir (Vatanabe ve ark 1997, Manera ve ark 2000).

Böbrek ve karaciğerde bulunan "metallothionein" kadmiyum ve çinkoyu değişik oranlarda bağlayan bir proteindir. Ayrıca vitaminlerin, bazı metallerin (kalsiyum, magnezyum, demir) de enzim aktiviteleri ve metabolizma hızını etkiledikleri gösterilmiştir. Genelde kalsiyum, bakır, demir, çinko ve magnezyum

gibi elementlerle, vitamin eksikliği biyotransformasyon kapasitesini düşürür. (Vural 2005).

Serbest radikallerle ilgili yapılan pek çok çalışma çinkonun antioksidan ve tedavi edici ajan olarak önemini vurgulamaktadır. Çinkonun antioksidan etkisini indirek yolla; hücre membran yapısını koruyarak, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin yapısına katılarak, metallotiyoneinin doku konsantrasyonlarını arttırarak, tiol grubu içeren proteinlerin oksidasyonunu engelleyerek ayrıca kritik bölgelerde demir ve bakır gibi redoks reaktif metallerin yerine geçerek gerçekleştirdiği bilinmektedir (Prasad 1998, Mahbooba ve Siddiquib 2002).

Çinko (Zn), çok sayıda metallo enzimde kofaktör olarak görev almasının yanı sıra antioksidan olarak da bilinen temel bir besin maddesidir (Bray ve Bettger 1990, Lapenna ve ark 1994, Ophir ve ark 1994, Powell ve ark 1994). Bakırın geçiş metali olarak radikal oluşturucu etkisini baskılayarak hidroksil radikali oluşumunu önler (Powell ve ark 1994).

Antioksidan savunma üzerine Zn'den fakir beslenmenin olumsuz, Zn'den zengin beslenmenin olumlu etkileri bildirilmiştir (Powell ve ark 1995, Pucheu ve ark 1995). Çeşitli kronik hastalıklarda kan ve doku düzeyindeki değişiklikler bildirilmekle birlikte İ/R gibi akut ve antioksidan savunmayı yakından ilgilendiren olaylardaki düzeyi ile igili kapsamlı bilgiler mevcut değildir (Yan ve ark 1991).

Özellikle dokuların beslenmesi ve oksijenizasyonu bozuldukdan sonra serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Reperfüzyonu takiben de ortaya çıkan bu serbest oksijen radikalleri sistemik dolaşıma katılarak periferde yıkıcı etkisini gösterir. Bu etkiyi önlemek için tanımlanan çok sayıda antioksidan olup bunlar arasında çinko ve melatonin de bulunur ve ajanlar arasında; C vitamini, E vitamini, mannitol, melatonin, bilirubin, allopurinol, cafeik asit fenil etil ester olup deneysel ve klinik birçok çalışmada kullanılmışlardır (Chen ve ark 1995).

İ/R hasarını önlemek için antioksidan ajan kullanımının faydalı olduğu kabul edilmesine rağmen kullanım zamanı tam olarak açıklanmamıştır. Aslında bu klinik uygulamada oldukça önemli bir noktadır. Eğer İ/R hasarı olmadan risk grubundaki

hastalara antioksidan madde verilirse faydalı olabileceği ileri sürülmüştür (Ceran ve ark 2001). Oysa başka bir çalışmada ise antioksidan İ/R sonrası uygulanmış ve faydalar sağlanmıştır (Kazez ve ark 2000). Bu çalışmalarda görüldüğü gibi antioksidan savunma mekanizması oksidatif stresi olumlu yönde etkilerken, antioksidan ajanın veriliş zamanı konusunda fikir birliği yoktur.

1.8.4. Melatonin ve Antioksidan Özellikleri

Pineal bez beynin orta hattında, üçüncü ventrikulun tavanında yer alıp, diamater ile sarılıdır. Pinealositler ve glial hücrelerden oluşur. Vücut büyüklüğüne oranla çok küçük olmasına karşın, böbreklerden sonra en fazla kanlanan ikinci organdır. Pineal bezin uyarılmasında sempatik sistem baskındır ve süperior sempatik gangliondan kaynaklanan sinir lifleri nervii conarii aracılığı ile beze ulaşır. Sempatik innervasyondan başka, az oranda parasempatik ve serotoninerjik sinir lifleri ile de innerve edilir. Pineal bezde birçok peptit yapıda hormon sentezlenmesine rağmen, ana hormonu melatonindir (Reiter 1991, Brezezinski 1997, Palaoğlu ve Beşkonaklı 1998).

Melatoninin (N-acetyl-5-metoxytriptamine) salgılanması sirkadiyen bir ritim gösterir (Snyder ve Axelrod 1967). Melatonin pineal bezde sentezlendikten sonra kan beyin bariyerini hızlı bir şekilde geçer ve serebrospinal sıvı, salya, ovaryum folikülleri, semen ve ammion sıvısında belirlenebilir (Pardridge ve Meitus 1980, Vakkuri 1985, Reiter 1986, Brzenzinski ve ark 1987, Nowak ve ark 1987, Bornman ve ark 1989, Shaw ve ark 1989, Kennaway ve Voultsios 1998, Rousseau ve ark 1999 Tan ve ark 1999). Metabolize olmayan küçük bir miktarı ise idrarla atılır (Reiter ve ark 2001b). Melatonin, memelilerde pineal beze ilave olarak over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlendiği gösterilmiş olmasına rağmen bu sentezin plazma melatonin düzeyine etkisi yok denecek kadar azdır. Sentezinin düzenlenmesi primer olarak geceye, diğer bir deyişle karanlığa bağlıdır. Dokulara ve hücrelere kolaylıkla girebilmektedir (Vermeulen ve ark 1993, Reiter 1995).

Üretim ve salınımı karanlık ile başlar ve aydınlıkla sona erer. Aydınlık dönemin uzaması veya aniden ışığa çıkılması melatonin üretimini durdurur. Bu

nedenle melatonin'e "karanlığın biyokimyasal tanımlayıcısı" şeklinde sembolik bir isim de verilmiştir (Reiter 1991).

Melatonin biyosentezi kandan pineal beze triptofanın alınması ile başlar. Aydınlıkta pineal hücrelerde triptofana, triptofan-5-hidroksilaz enzimi yardımıyla ·OH grubu eklenir ve 5-OH-triptofan oluşur. 5-OH-triptofan, asit L-aminoaromatik dekarboksilaz enzimi aracılığıyla serotonine çevrilir. Karanlıkta serotonine, norepinefrin ve serotonin-N-asetil transferaz enzimi etkisiyle asetil grubu eklenerek N-asetil serotonin oluşur. Oluşan N-asetil serotonine ise hidroksiindol-Ometiltransferaz enzimi aracılığıyla metil grubu eklenerek N-asetil-5-metoksitriptamin (melatonin) oluşturulur (Reiter 1991, Yılmaz 1999).

Hem yağda hem de suda çözünebilir özelliğe sahip olan melatonin, çekirdek dahil hücrenin her organeline kolaylıkla ulaşabilir. Bu özellik, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır (Sewerynek ve ark 1995, Longoni ve ark 1998, Kuş ve Sarsılmaz 2002, Reiter ve ark 2005, Cheung ve ark 2006, Kılıç ve ark 2012). Son çalışmalarda melatoninin hücre çekirdeğinde yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve melatonin için spesifik bağlanma noktalarının olduğunu gösterilmiştir. Melatonin güçlü bir radikal süpürücüsü olduğu gibi, radikaller üzerinde dolaylı etkilere de sahiptir. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O_2^- radikalini H_2O_2'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve $NO^{\cdot}$ oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir. Oksidatif hasarın rol oynadığı iskemi-reperfüzyon dahil pek çok deneysel modelde (yanık hasarı, ülser, ve ilaç toksisiteleri, tümor oluşumu gibi) melatoninin olumlu etkileri gösterilmiştir (Veneroso ve ark 2009, Luchetti ve ark 2010). Yaşlanmayla birlikte melatonin üretiminin azalması yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde artan oksidan hasarın ve melatonin yetersizliğinin önemli rolünü göstermektedir (Reiter ve ark 1997, Reiter ve ark 1999, Reiter ve ark 2000a, Reiter ve ark 2000b, Rodriguez ve ark 2004).

Melatoninin birçok biyolojik etkisinin yanı sıra, hücre içi kalsiyum düzeyini dengeleyebilmesi, güçlü bir radikal süpürücü (hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonu) ve antioksidan

(SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz stimulasyonu ve nitrik oksit sentaz inhibisyonu) özelliğinin olması da (Kavaklı ve ark 2007), kanser kemoterapisine ve radyoterapisine bağlı organ hasarlarında koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir (Edwards ve ark 1984, Verma ve Sonwalker 1991, Koçak ve ark 2003, Öz ve İlhan 2006, Kılıç ve ark 2013). Bir *in vitro* çalışmada melatoninin glutatyondan 5 kat, mannitolden ise 14 kat daha güçlü bir hidroksil radikali olduğunu göstermiştir. Ayrıca melatonin bir prooksidatif enzim olan nitrik oksid sentezinin aktivitesini artırır (Majsterek 2005).

Barsak, böbrek, beyin, ekstremite ve karaciğerde yapılan İ/R deneyleri gerçekte klinikte sıkça karşılaşılan dolaşım şoku, dissemine intravasküler koagülasyon ve organ cerrahileri sırasında sıkça karşılaşılan İ/R hasarının taklit edildiği deney modelleridir. Bu modellerde test edilen ve geliştirilen antioksidan ajanların kliniğe uygulanması uzun süreçlere dayansa da, çeşitli patolojik durumlarda ya da cerrahi işlemlerde organ koruyucu olarak tedavi protokollerinde yer verilen pek çok antioksidan bulunmaktadır.

Lerner ve arkadaşları 1958 yılında pineal bezden elde ettikleri doku özlerini amfibialara verdiklerinde, amfibiaların deri renginin açıldığını görmüşler ve bu hormonu melatonin olarak adlandırmışlardır. Bundan on yıl sonra pineal bezin işlevlerinde aydınlık ve karanlığın rolü bildirilmiştir (Palaoğlu ve Beşkonaklı 1998).

Serum melatonin düzeyi yaşa göre değişiklik gösterir. Yenidoğanda melatonin düzeyi oldukça düşüktür. Üçüncü aydan sonra melatonin sekresyonu ritmik özelliğini kazanır. En yüksek melatonin seviyesi yaşamın üç ile beşinci yılları arasında saptanır. Yaşlanmayla birlikte melatonin sekresyonu azalır (Reiter 1991). Cinsiyetin melatonin salınımı üzerine etkisinin olmadığı bildirilmektedir (Fourtillan ve ark 2001).

Farmakolojik olarak memelilerde hücre zarına bağlı MT1 (yüksek afiniteli) ve MT2 (düşük afiniteli) olmak üzere iki farklı melatonin reseptörü bildirilmektedir. Hormona özgü reseptörler hücredeki etkinliğini G proteini aracılığıyla gerçekleştirir. MT1 reseptörleri başlıca hipotalamusun suprakiyazmatik çekirdeğinde tespit edilirken, MT2 reseptorleri retina, hipokampus ve diğer beyin bölgelerinde

belirlenmiştir (Reppert ve ark 1996). Melatonin reseptörleri ayrıca mide-bağırsak kanalı, gonadlar, böbrek ve kan damarlarında da bulunur. Ratlarda melatonin reseptörlerine T ve B lenfositlerde rastlanılırken (Pozo ve ark 1997), insan T lenfositlerinde de melatonin reseptörlerinin varlığı bildirilmiştir (Carrilo ve ark 2004). İmmun fonksiyonun güçlenmesinde MT2 reseptörünün önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Reppert 1997, Drazen ve ark 2001, Hotchkiss ve Nelson 2002).

Melatonin karaciğerde metabolize olur ve başlıca metaboliti 6-hidroksimelatoninsülfat (6-HMS)'dır. İnsanlarda ekzojen melatoninin kısa bir metabolik yarı ömrü (20-60 dakika), büyük bir hepatik geçiş etkisi vardır (Altun ve ark 2001). Melatonin, yaşlanma-karşıtı bir moleküldür, kimyasal karsinojenlere karşı DNA'nın korunması, endokrin ritmin düzenlenmesi, bazı antigonadotropik etkilerin açığa çıkarılması, sinir sistemi üzerinde koruyucu etkilerin oluşturulması, immün sistemin uyarılması ve serbest radikallerin giderilmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev alır. Melatoninin farklı organ ve dokularda direkt serbest radikal süpürücü ve indirekt antioksidan etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Yildirim ve ark 2006, Aydoğdu ve ark 2007).

Melatonin diğer antioksidanların etkisini artırır (Urata ve ark 1999, Gitto ve ark 2001) ve antioksidan enzimlerin sentezini stimüle eder (Reiter ve ark 2000b).

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

Mevcut çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen 60 adet erkek Wistar-albino türü erkek sıçan üzerinde ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi deney hayvanları etik kurulundan alınan onay ile aynı fakültenin araştırma merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan deney hayvanları ortalama olarak 250-260 gr ağırlığındaydı. Sıçanlar randomize olarak eşit sayıda olmak üzere toplam altı gruba ayrıldı. Bütün sıçanlara ısı ve ışık miktarları kontrol edilen odalarda su ve yemleri sağlanarak bakıldı.

Deney Grupları şu şekilde oluşturuldu.

1-Kontrol grubu (n=10): Bu gruptaki hayvanlar herhangi bir uygulama yapılmadan dekapite edildikten sonra böbrek dokusu ile kanları alındı.

2-Sham-kontrol grubu (n=10): Sıçanlar kas içi (i.m) olarak uygulanan ketamin hidroklorür (60 mg/kg) ve Xylasine (rompun) (5 mg/kg) ile anestezi edildikten sol böbrek bölgesi temizliği yapıldıktan sonra cerrahi olarak açıldı ve takiben öldürülen hayvanların böbrek ve kanları alındı.

3-Renal iskemi-reperfüzyon grubu (İ/R) (n=10): Genel anestezi yapılan hayvanlarda sol böbrekler 45 dakika iskemi ve 1 saat reperfüzyona tabi tutulduktan sonra hayvanları öldürülerek ilgili doku ve kanları analiz için alındı.

4-Çinko + Renal İ/R grubu (n=10): Bu gruptaki deney hayvanlarında öncelikli olarak 3 hafta süresince 3 mg/kg/gün dozunda periton içi çinko uygulanmak suretiyle takviye gerçekleştirildi, çinko takviyesinin bitiminde yukarıda belirtildiği şekilde böbrek iskemi-reperfüzyonu oluşturulmasını takiben ilgili doku ve kanları alındı.

5-Melatonin + Renal İ/R grubu (n=10): Çalışmanın bu grubunda hayvanlara 3 hafta süresince 3 mg/kg/gün olarak periton içi melatonin takviyesi yapıldı, uygulamanın bitiminde böbrek iskemi-reperfüzyonu oluşturularak böbrek dokusu ile kanları alındı.

6-Zn+Melatonin + Renal İ/R grubu (n=10): Deney hayvanlarına eşit dozlarda olmak üzere çinko ve melatoninin yukarıda belirtilen 3 haftalık takviyelerini takiben İ/R gerçekleştirildi, cerrahi uygulamanın bitiminde hayvanlar öldürülerek kan ve böbrek dokuları alındı.

2.2. Kan ve Doku Alımı

Deneylerin bitiminde öldürülen hayvanlardan 3-4 ml kadar kan EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kan dokusunda eritrosit GSH analizi için serum fizyolojikle yıkanarak depolanırken elde edilen plazmalar ise MDA analizi için depolandı. Ayrıca hayvanlardan alınan böbrek doku örnekleri MDA ve GSH tayini için analiz zamanına kadar -80^{o} C'de muhafaza edildi. Ayrıca formaldehide konulan böbrek dokuları ise daha sonra histopatolojik olarak değerlendirildi.

2.3. Kan ve Doku Analizleri

2.3.1. Protein Tayini

Protein tayini biüret metoduyla yapıldı.

Analizi yapılacak olan doku tartıldıktan sonra tüplere konuldu ve 4^{o}C'de Misonix's Microscan ultrasonic doku parçalayıcısında 150 mM KCl'de %10'luk homejenat oluşacak şekilde parçalandı. Elde edilen homojenatlar 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. 50µl süpernattan üzerine 1ml sodyum sülfat ilave edilmesinin ardından 1ml biüret ayıracı eklendi ve 5 dakika sonra, 50µl distile su, 1ml sodyum sülfat ve 1ml biüret ayıracının ilave edilmesiyle hazırlanan köre karşı okutuldu.

Biüret Ayıracı için 2,5gr bakır sülfat, 10gr sodyum potasyum tartarat bir miktar distile suda çözülüp üzerine 2.5N NaOH'dan 350 ml ilave edilip bu karışımın distile suyla 1lt'ye tamamlandı.

2.5N NaOH için 50gr NaOH distile su ile 500ml'ye tamamlandı.

Sodyum Sülfat için 20gr sodyum sülfat alınarak 100ml distile suyla seyreltildi.

Değerler gr/dl olarak ifade edildi. Nmol/gram protein cinsinden aşağıda gösterildiği gibi hesaplandı.

HESABI: $A = a \times b \times c$

$c = A / a \times b$

$c = [A / 1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \times 1 \text{ cm}] \times$ dilüsyon faktörü

$c = (A / 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}) \times 17$

$c = A \times 108.9$ nmol/mol şeklindedir.

2.3.2. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi

Doku MDA düzeyi Uchiyama ve Mihara (3) yöntemiyle gerçekleştirildi. Analizi yapılacak olan doku tartıldıktan sonra parçalara ayrılarak tüplere konuldu ve 4^oC'de Misonix's Microscan ultrasonic doku parçalayıcısında 150 mM KCl'de %10'luk homojenat oluşacak şekilde parçalandı. Homojenize dokudan 2 ml alınarak üzerine sırasıyla, 2 ml %8'lik $HClO_4$'ye konularak 3000 devirde 15 dakika santrifüj edildi. 0,5 ml süpernatant'a 3ml %1'lik H_3PO_4 ve 1 ml % 0,675'lik TBA ilave edilerek 90^o'lik su banyosunda 45 dakika inkübasyon yapıldı. Karışımın soğutulmasından sonra, üzerlerine 4 ml n-bütanol ilave edildi ve n-bütanole karşı 532 nm'de absorbansı okundu. Konsantrasyon c=108.9A olarak sağlandı. Sonuç mg/g protein olarak tanımlandı (Uchiyama ve Mihara, 1978).

2.3.3. Doku Glutatyon Analizi

GSH düzeylerini belirlemek için MDA'da tanımlandığı gibi doku 4^oC'de 150 mm KCl'de %10'luk homojenat oluşacak şekilde homojenize edilerek, 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Örneklerin GSH miktarları Ellman's metoduyla ölçüldü. 200µl süpernatant için, 8 ml fosfat buffer (pH 6,8), 78 ml 1 N NaOH ve 100µl Ellman's solüsyonu ilave edilerek 5 dakika bekletildikten sonra

spektrofotometre cihazında 412 nm'de distile suya karşı absorbansları okundu. Aktivite a=($A_{standard}/A_{örnek}$) x $C_{standard}$ olarak hesaplandı. Burada $c_{standard}$=15.36 g/dl olarak verildi. Doku proteini Biüret metoduyla elde edilerek değerler nmol/gr protein olarak hesaplandı (Elmann 1959).

2.3.4. Plazma Malondialdehid Seviyelerinin Belirlenmesi

EDTA'lı tüpe alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve sonrasında plazmaları ayrıldı. Bir deney tüpüne 2,5 ml %10'luk TCA (tricholoroessigaure krist., Merck katalog no: 818 K02907810) üzerine 0,5 ml plazma numunesi alındı. Vortekslenip tüplerin ağızları kapatıldı. 90^{o}'lik su banyosunda 15 dakika inkübasyon uygulandı. Soğuk su altında soğutulup spektrofotometrede 532 nm'de, köre karşı absorbansları okundu. Sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

Kör, deney başlangıcından itibaren kör tüpüne plazma yerine aynı miktarda distile su konulup aynı işlemlerin yapılmasıyla hazırlandı.

2.3.5. Eritrosit Glutatyon Analizi

Eritrosit GSH ölçmek amacıyla EDTA'lı tüplere alınan kan numuneleri 3000 rpm'de 5 dak santrifij edildi. Sonrasında plazmaları ayrıldı. Eritrosit numunelerimiz 3 kez %0,9'luk serum fizyolojikle yıkandı. Elde edilen yıkanmış eritrosit numunelerinden 50µl alındı ve üzerlerine sırasıyla 450µl distile su, %10'luk sülfosalisilik asitten 500µl ilave edildi. Karışımın 1 saat buzda soğutulmasından sonra, 4000 devirde 3 dakika santrifüj edildi. Sonra süpernatantın 200µl'si alınarak üzerine sırasıyla, pH'ı 6,8 olan olan fosfat buffer'den 8 ml, 1 N NaOH'den 78 µl ve Ellman solüsyonunundan ise 100µl ilave edildi. 5 dakika sonra spektrofotometre cihazında 412nm'de reagant tüpünde distile suya karşı absorbansları okundu. Ellman solusyonu 100 mg 5'-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic asitin (DTNB; Sigma, katalog no. D-8130) fosfat bufferin pH 7,8, 100 ml'sinde çözdürülmesiyle hazırlandı. GSH standardı 15.34mg/100 ml olarak ve 15.34 mg indirgenmiş glutatyonun (Sigma, katalog no: G-4251) 1 nm sodyum EDTA'nın 100 ml'sinde çözdürülmesiyle hazırlandı (Atroshi ve Sandholm, 1981). Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

2.4. İstatistik

İstatistik analiz SPSS istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama±standard sapma olarak tanımlandı. Gruplararası karşılaştırma için Kruskal-Wallis variyans analizi kullanıldı ve $p<0.05$ seviyesi için Mann-Whitney U-testi uygulandı. $P<0.05$ seviyesi istatistik olarak önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Değerlendirme

Deney gruplarına ait doku GSH değerleri tablo 1'de verilmiştir. Gruplararası değerleri incelediğinde en yüksek doku GSH miktarına grup 4, 5 ve 6'nın sahip olduğu belirlendi ($P<0.005$) (Çizelge 3.1., Şekil 3.1.). Grup 3'ün GSH değeri grup 1 ve 2'ye göre artış göstermesine rağmen istatistik olarak bir önem belirlenememiştir. Çalışma gruplarının doku MDA seviyeleri incelendiğinde bu parametrenin iskemi-reperfüzyon grubunda en yüksek olduğu tespit edilmişken ($P<0.002$) diğer gruplararasından önemli bir farklılık tespit edilmedi (Çizelge 3.1., Şekil 3.1.).

Deney grupların ait eritrosit GSH ve plazma MDA değerleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Eritrosit GSH seviyeleri incelendiğinde renal iskemi reperfüzyon grubunun en düşük değere sahip olduğu belirlendi ($P<0.005$) (Çizelge 3.2., Şekil 3.2.). Melatonin + İ/R grubu ise en yüksek eritrosit GSH değerlerine sahipti ve diğer grupların tamamına göre önemli oranda artmış olarak belirlendi ($P<0.005$) (Çizelge 3.2., Şekil 3.2.). Diğer gruplar arasında ise istatistik olarak önemli bir farklılık belirlenmedi.

Plazma MDA seviyeleri incelendiğinde bu parametrenin iskemi-reperfüzyon grubunda en yüksek olduğu tespit edildi ($P<0.001$) (Çizelge 3.2., Şekil 3.2.). Diğer gruplar arasında ise önemli bir farklılık görülmedi.

Çizelge 3.1. Çalışma Gruplarının Doku GSH ve MDA Değerleri.

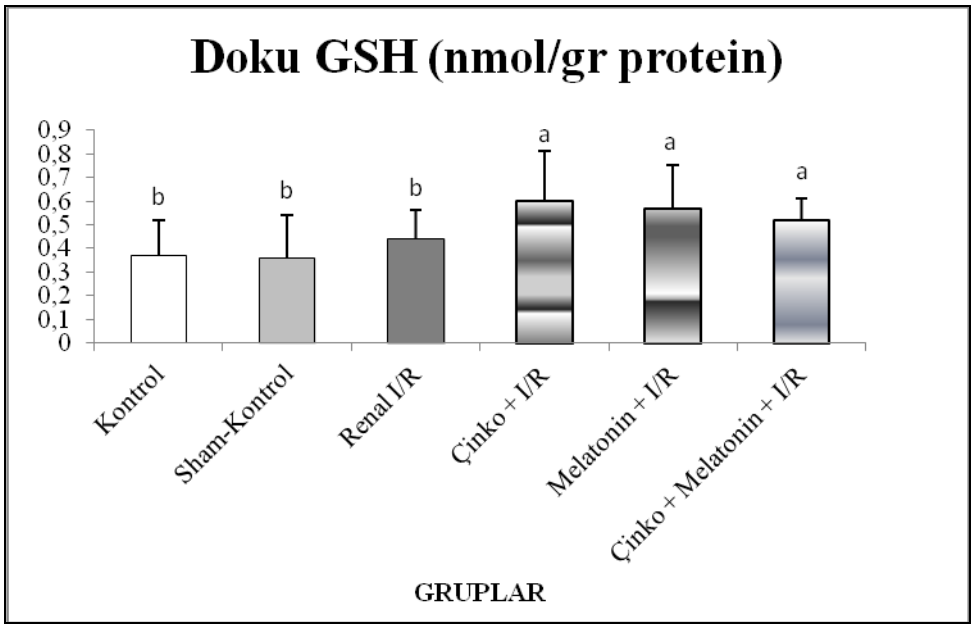
Gruplar	**GSH (nmol/gr protein)**	**MDA (mg/g protein)**
Kontrol grubu (n=10)	0.37±0.15 **b**	0.12±0.08 **b**
Sham-kontrol grubu (n=10):	0.36±0.18 **b**	0.07±0.03 **b**
Renal iskemi-reperfüzyon grubu (İ/R) (n=10)	0.44±0.12 **b**	0.28±0.20 **a**
Çinko+ Renal İ/R grubu (n=10)	0.60±0.21 **a**	0.11±0.06 **b**
Melatonin + Renal İ/R grubu (n=10):	0.57±0.18 **a**	0.08±0.05 **b**
Zn+Melatonin + Renal İ/R grubu (n=10)	0.52±0.09 **a**	0.06±0.04 **b**

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistik olarak önemlidir. (GSH için P<0.005; MDA için P<0.002).

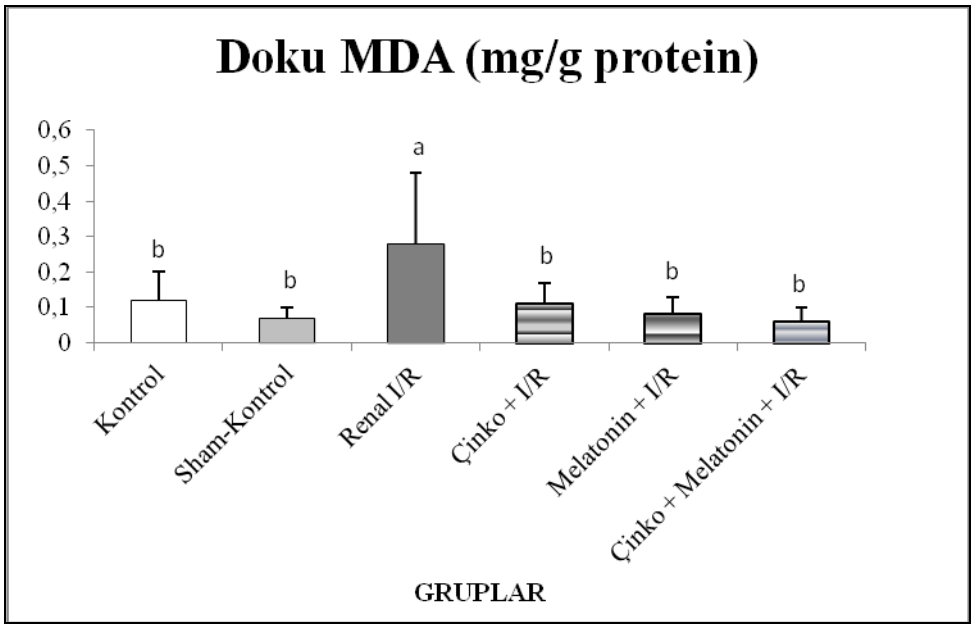
Çizelge 3.2.Çalışma Eritrosit GSH ve Plazma MDA Değerleri.

Gruplar	**Eritrosit GSH (mg/dl)**	**Plazma MDA (nmol/ml)**
Kontrol grubu (n=10)	0.32±0.04 b	0.10±0.03 b
Sham-kontrol grubu (n=10):	0.32±0.06 b	0.12±0.02 b
Renal iskemi-reperfüzyon grubu (İ/R) (n=10)	0.22±0.06 c	0.22±0.06 a
Çinko+ Renal İ/R grubu (n=10)	0.27±0.07 b	0.08±0.05 b
Melatonin + Renal İ/R grubu (n=10):	0.36±0.11 a	0.10±0.07 b
Zn+Melatonin + Renal İ/R grubu (n=10)	0.29±0.06 b	0.08±0.03 b

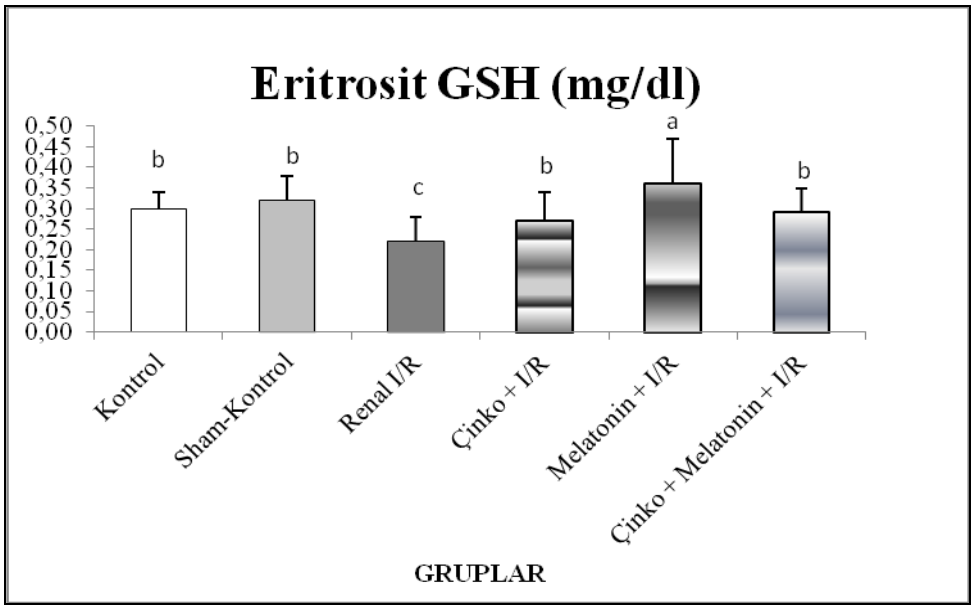
*Aynı sütundaki farklı harfler istatistik olarak önemlidir. (GSH için P<0.005; MDA için P<0.001).



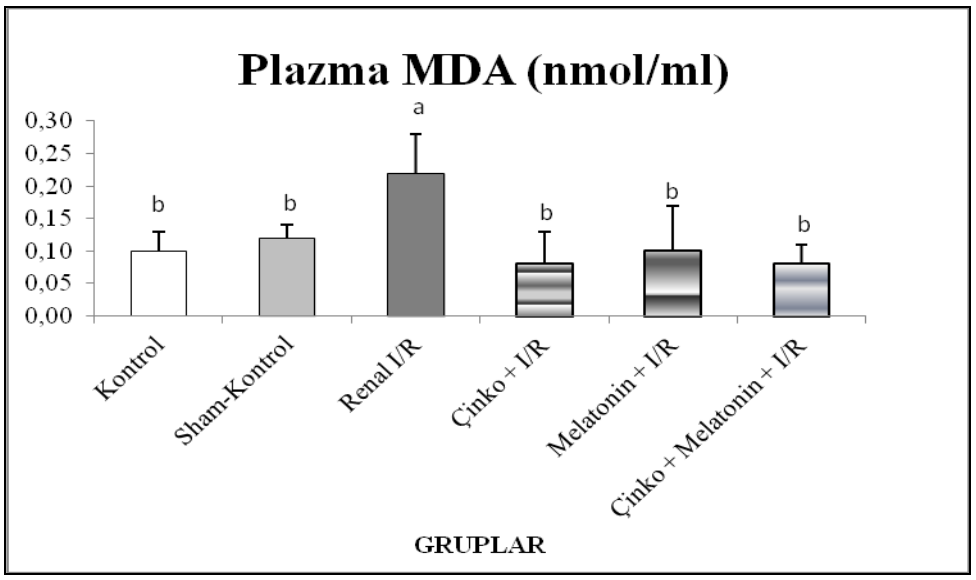
Şekil 3.1. Çalışma Gruplarının Doku GSH Değerleri (P<0.005) a>b



Şekil 3.2. Çalışma Gruplarının Doku MDA Değerleri (P<0.002) a>b



Şekil 3.3. Çalışma Gruplarının Eritrosit GSH Değerleri (P<0.005) a>b>c



Şekil 3.4. Çalışma Gruplarının Plazma MDA Değerleri (P<0.001) a>b

3.2. Histopatolojik Değerlendirme

Histolojik boyama prosedürleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Sıçanlardan alınan böbrek doku örnekleri cerrahi sonrası zaman kaybetmeden % 10'luk tamponlu formaldehit içerisine tesbit amacı ile kondu. Tesbit işlemi sonrası dokulardan, mümkün olduğunca aynı bölgelerden olmak üzere, uygun örnekler otomatik doku takip cihazına (Leica ASP300 S - Tissue Processing) kasetler içerisinde yerleştirildi. Doku

takibi işlemi sonrasında dokular parafin bloklara gömüldü. Bloklardan mikrotom (Leica RM 2025 microtome) yardımıyla 5 μm kalınlığında kesitler lizinli lamlar üzerine alındı ve lamlar Hematoksilen & Eozin ile boyandı.

Çalışmamızın histopatolojik sonuçları aşağıda belirtildiği gibidir.

Kontrol Grubu: Hiçbir uygulama yapmadığımız kontrol grubuna ait sıçanların böbreklerinde tubüler ve glomerüler yapı normal görünümündeydi. Korteksde de tubüller ve glomerüller normal görünümdeydi. Nekroz yoktu. Böbrek dokusunun korteks, medulla, tubüller glomerüller normal yapıdaydı. İnflamasyon tespit edilmedi. Hafif konjesyon vardı. Fırçamsı kenarlar normal yapıdaydı. Çekirdekleri normal, tubüluslar dolgundu.

Sham Grubu: Bu grup sıçanların böbreklerinde ise, tubül epitelinde nekroz yoktu. Tubüllerde nekroz görülmedi. Duktus epitellerinde düzleşme ve %5-10 oranında nekroz tespit edildi. Tubüler epitelde düzleşme minimal düzeydeydi. Hücrelerde vakuolizasyon %10-20 oranında görüldü. Fırçamsı kenar kaybı hafif derecede yaklaşık %10 kadar olduğu tespit edildi. Tubüler lümende % 5 obstrüksiyon vardı. Tübuluslarda incelme %5 kadardı. Medullada hafif derecede mononükleer hücre inflitrasyonu mevcuttu. Korteks glomerülleri normaldi. Kontrol grubundaki gibi hafif konjesyon vardı. Glomerüler aralıkta artış vardı. Fazlaca nükleus mevcuttu. Genellikle normal görünümdeydi ve kontrol grubundan anlamlı bir değişiklik yoktu. Tubüllerin lümenlerinde açılma var. İnflamasyon tespit edilmedi. Tubüllerde fırçamsı kenarlar normal yapıdaydı. Fırçamsı kenar kaybı veya normal yapısında anlamlı herhangi bir değişiklik yoktu. Tubülüslerde çok az (yaklaşık %10 kadar) incelme ve fırçamsı kenar kaybı vardı. Tubüller obstrüksiyon yönünden değerlendirildiğinde ise bariz bir obstrüksiyon tespit edilmedi. Kortekste ve tubüllerde nekrotik değişiklikler minimal ya da yok denecek kadar azdı. Tubüllerde anlamlı bir değişiklik yok.

İskemi-Reperfüzyon Grubu: Tubüler epitelde %70 oranında düzleşme, medullada konjesyon ve hemoraji odakları mevcuttu. Hücresel vakuolizasyonun %40 olduğu tespit edildi. Obstrüksiyon net değerlendirilemedi. Glomerüller normal yapıdaydı. Korteks ve medullada %40 kadar triodizasyon görünümü tespit edildi.

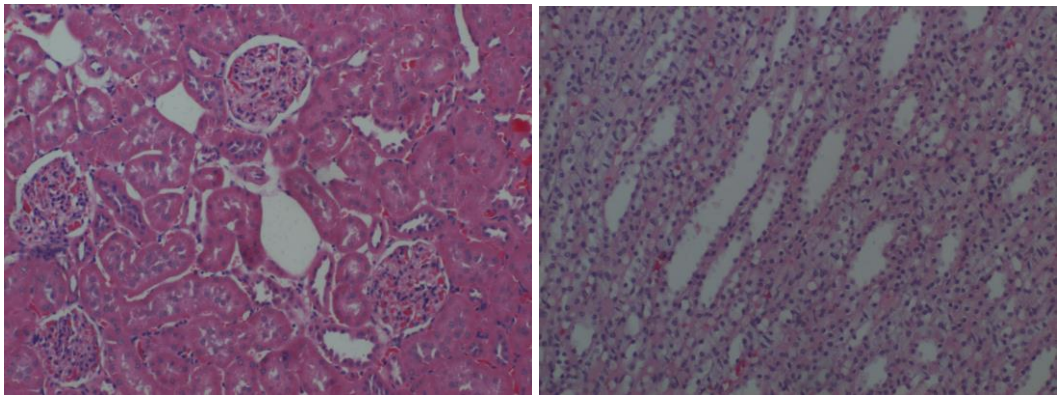
Böbreğin genelinde %5-10 civarında tubüllerde triodizasyon (için sekresyon dolu tubüller) olduğu tespit edildi. Medullar bölgede daha yoğun olmak üzere korteksde de vardı. İntratubüler sekresyon görülen yerlerde aynı zamanda tubüler incelmede mevcuttu. Glomerüller kontrol grubundaki böbreklerle aynıydı, değişiklik yoktu. Tubüler epitel de yaklaşık %70 incelme vardı. Korteks tubüllerinde % 40 kadar, kortikal tubüllerde ise daha az oranda fırçamsı kenar kaybı vardı. Kortikal lümende intratubüler ve intrastoplazmik dense eozinofilik globüllerden %5-10 kadar birikmeler vardı. Ancak bu durum medullada görülmedi. İskemik nekroz alanlar %5-10 civarındaydı ve daha çok kortikal alanlarda görüldü. Perikapsüler yağ dokusunda iltihabi hücreler vardı. Perirenal yağ dokusunda hafif nötrofil ve lenfosit artışı mevcuttu. Tubüler obstrüksiyon genellikle kortikal alanda olmak üzere %4-5 civarındaydı. Çoğunlukla medullada olmak üzere tubüler hücrelerde stoplazmik vakolizasyon tespit edildi. Kortekste ise bu durum çok nadirdi. İntrastoplazmik vakolizasyon ise %40 oranında görüldü. Üst medullada intrastoplazmik triodizasyon olan bölgelerde %30 kadar vakolizasyon vardı. Kortekste ise vakuolizasyon %1-2 oranında tespit edildi.

Çinko Takviyeli Grup: Glomerüller normal görünümdeydi. Medullar konjesyon ve hemoraji İ/R grubuna benzer şekildeydi. Korteks glomerülleri normal yapıdaydı. Tubüler düzleşme %10, nekroz ise %15 kadardı. Triodizasyon IR grubuna kıyasladığımızda çok az görüldü. Kortikal alanda ise %2-3 oranındaydı. 21 gün boyunca 3mg/kg çinko uyguladığımız bu grupla kontrol grubu en yakın görünüme sahipti. İltihabi hücre yoktu. Konjesyon daha belirgindi. Tubüler incelme vardı fakat çok azdı, yaklaşık %5-6 civarındaydı. Korteksin fokal bir alanında daha belirgindi. Fırçamsı kenar kaybı %5-6'ydı. Kortikal bölgede intratubüler ve intrastoplazmik dense globül birikiminin %1 olduğu tespit edildi. Tubüler obstrüksiyon %5-6 oranında görüldü. Vakuolizasyon üst medullada %15-20 kadardı. Kortekste ise belirgin olmamakla birlikte intrastoplazmik vakolizasyon %1-2 civarındaydı.

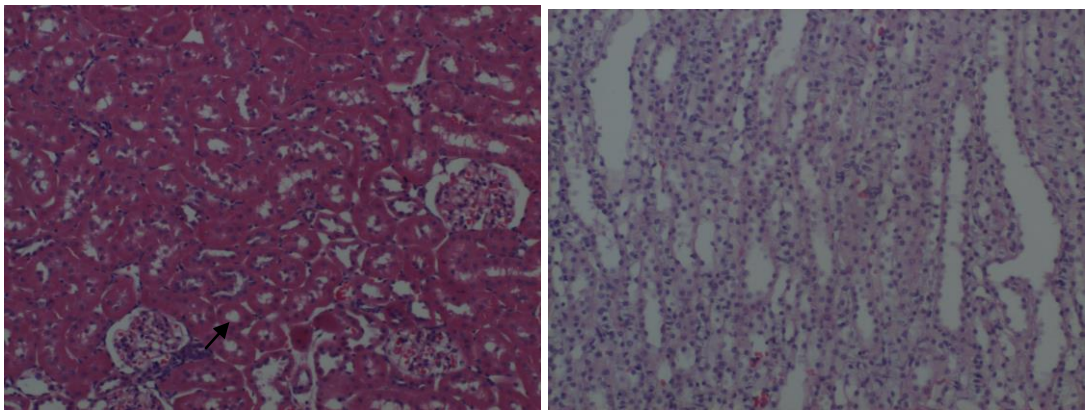
Melatonin Takviyeli Grup: 3 hafta boyunca 3mg/kg'dan melatonin uyguladığımız bu grubun böbreklerinde tubüler incelme %5 oranındaydı. Glomerüller normal yapıdaydı. Medullada hafif konjesyon mevcuttu. Nekroz ise %5 civarında tespit edildi. Fırçamsı kenar kaybının %5 olduğu görüldü. Distal tubüllerdeki genişleme normale yakındı. Korteks medulla bileşkesinde hafif derecede

mononükleer hücre infiltrasyonu mevcuttu. Çok az iltihabi hücreler vardı. Triodizasyon görülmedi. İntratubüler ve intrastoplazmik globüller kortikal alanda %1 kadardı. Tubüllerde %15-20 oranında incelme vardı. Kortikal bölgede fokal alanlarda ve üst medullada lenfosit ve nötrofilleri içeren iltihabi hücre infiltrasyon mevcuttu. Çoğunluklada plazmosit, lenfosit ve daha az oranda nötrofil görüldü. Perirenal kapsül dışı yağ doku içinde eozinofil ve mast hücreleri vardı ve kortikal interstisyelde daha fazla oranda tespit edildi. Obstrüksiyon %10 ve vakuolizasyon %1-2 oranında olduğu görüldü.

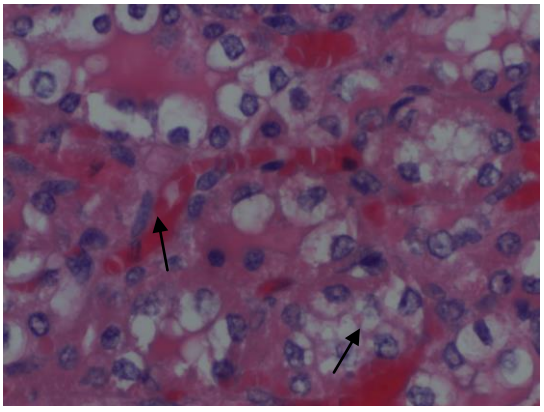
Çinko + Melatonin Takviyeli Grup: Melatonin ve çinko+melatonin uyguladığımız gruplar birbirlerine benzer görünümdedirler. Konjesyon mevcut. Duktal lümen genişlemeleri var. Tubülus epitel incelmesi %30 kadardı. Triodizasyon görülmedi. İnflmasyon yok ya da ciddi olarak azalmış durumdaydı. Tubüler incelme kortikal alanda %15 oranındaydı. Fırçamsı kenar kaybının %15 olduğu tespit edildi. Tubüler obstrüksiyon %2 civarında görüldü. Nekroz %10'du. Vakolizasyon ise %5 oranında medular tubüllerde intrastoplazmik kısımda görüldü.



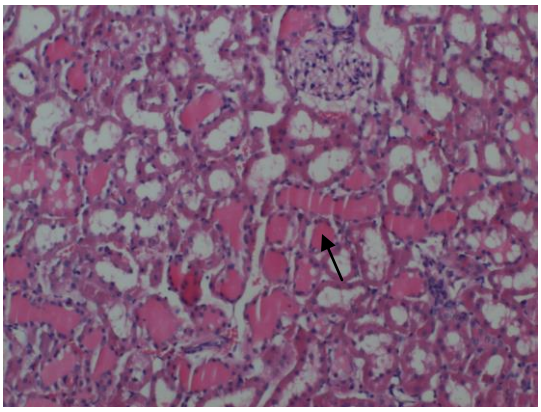
Şekil 3.5. x100; HxE; kontrol grubuna ait böbreğin sırasıyla korteks ve medullası, normal yapıda bir görünüm elde edildi.



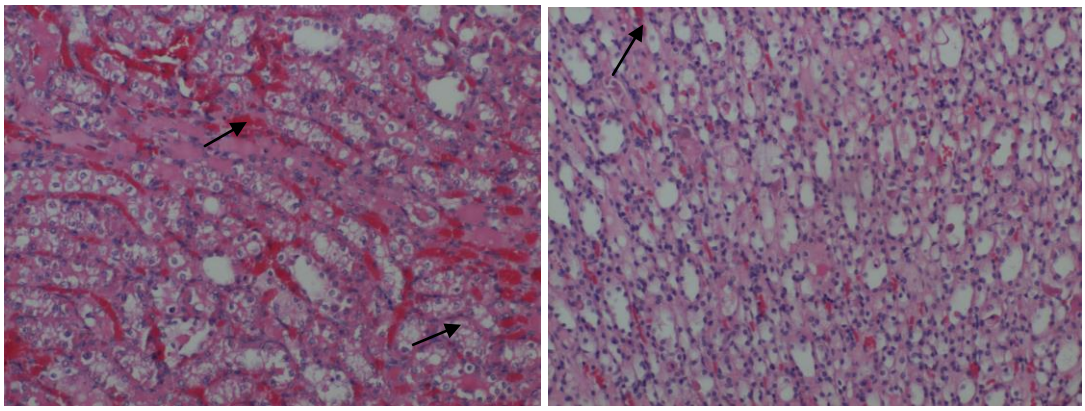
Şekil 3.6. x100; HxE; sham grubuna ait böbreğin sırasıyla korteks ve medullası, Böbrek korteksinde tubüler epitelde düzleşme görüldü (ok). Böbreğin korteksinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi.



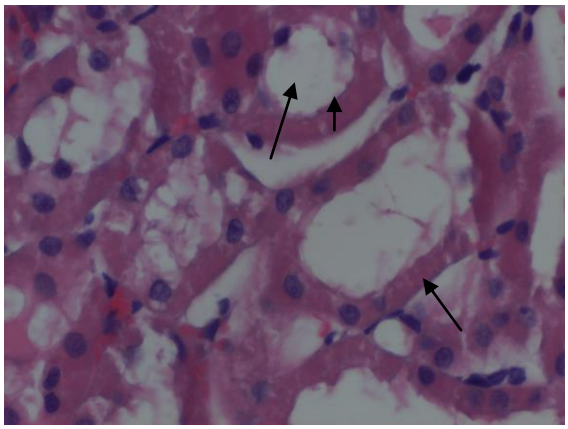
Şekil 3.7. x400; HxE; iskemi reperfüzyon grubuna ait böbrek korteksinde konjesyon, vakuolizasyon görüntüleri (ok).



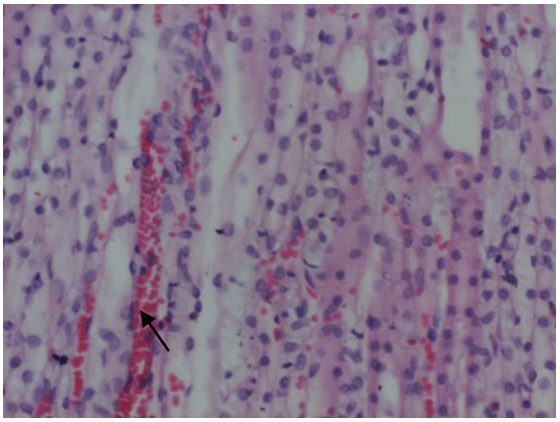
Şekil 3.8. x100; HxE; iskemi reperfüzyon grubuna ait böbrek korteksinde triodizasyon görüntüleri (ok).



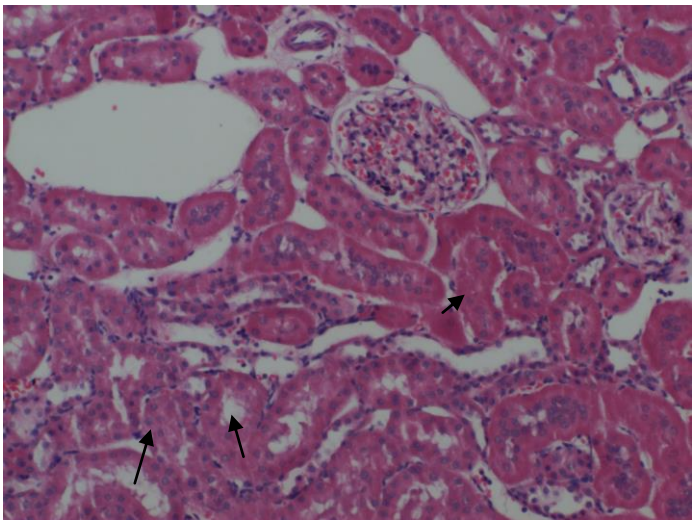
Şekil 3.9. x100; HxE; iskemi reperfüzyon ait böbreğin korteks ve medullasında konjesyon, korteksinde vakuolizasyon görüntüsü (ok).



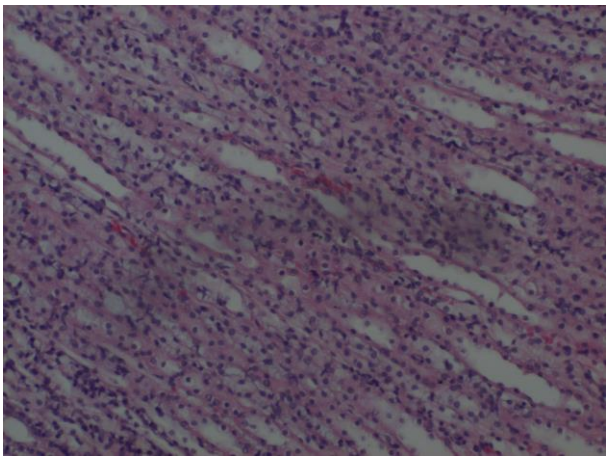
Şekil 3.10. x400; HxE; iskemi reperfüzyon grubuna ait böbreğin korteksinin tubüler epitelinde incelme, nekroz ve fırçamsı kenar kaybı (ok).



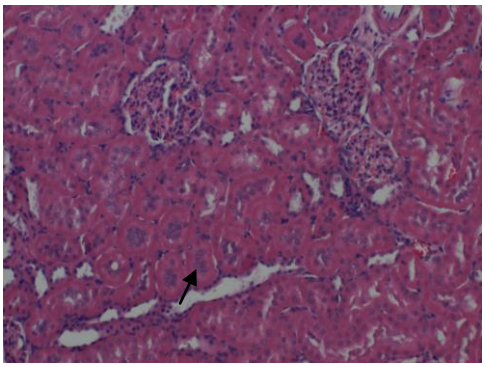
Şekil 3.11. x200; HxE; çinko takviyesi yapılan gruba ait böbreğin korteksinde hafif hemoraji görüldü (ok).



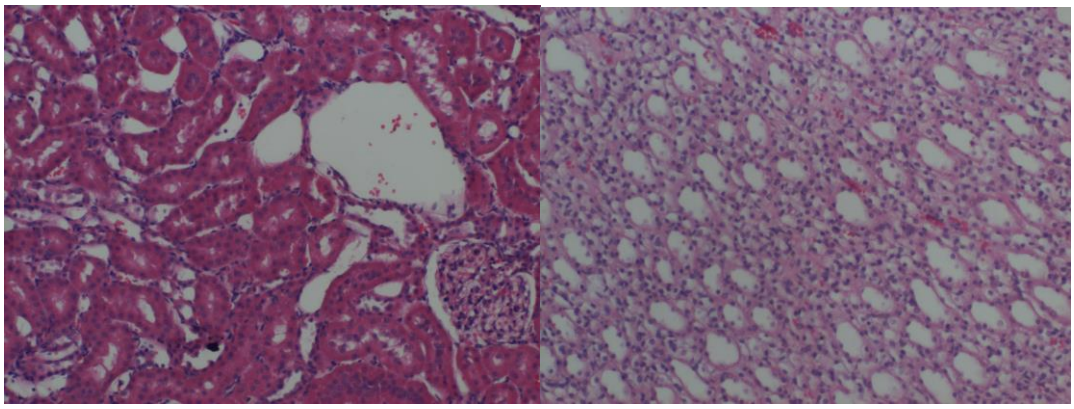
Şekil 3.12. x100; HxE; çinko verilen gruba ait böbreğin korteksinde normale yakın görünüm elde edildi. Tubül obstrüksiyonu, minimal nekroz ve fırçamsı kenarlarda hafif düzleşme görüldü (ok).



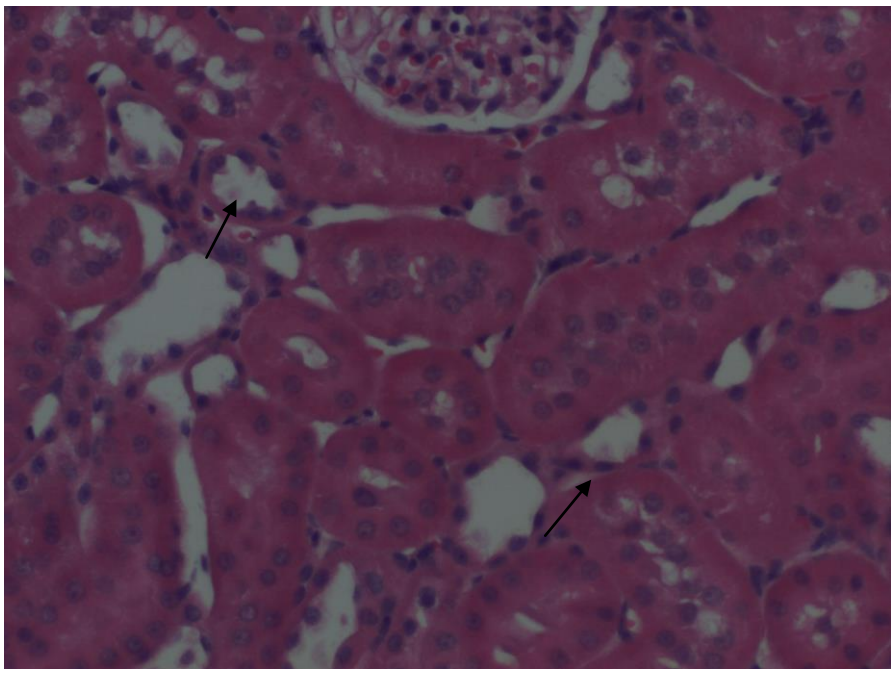
Şekil 3.13. x100; HxE; melatonin takviyesi verilen gruba ait böbreğin medullasında normale yakın görünüm tespit edildi (ok).



Şekil 3.14. x100; HxE; melatonin takviyesi verilen gruba ait böbreğin korteksinde normale yakın bir görünüm elde edildi. Obstrüksiyon görüldü (ok).



Şekil 3.15. x100; HxE; çinko+ melatoninin takviyesinin kombine uygulandığı gruba ait böbreğin korteksinde ve medullasında normale yakın görüntü elde edildi.



Şekil 3.16. x100; HxE; çinko+ melatoninin takviyesinin kombine uygulandığı gruba ait böbreğin korteksinde normale yakın görüntü elde edildi. Fırçamsı kenar kaybı ve hafif nekroz görüldü (ok).

4. TARTIŞMA

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada sıçanlarda uygulanan 45 dakika süreli iskemi ve takiben 1 saat reperfüzyona bağlı olarak böbrek dokusunda lipid peroksidasyonun göstergelerinden birisi olan malondialdehid değerleri hem bahsedilen dokuda hem de plazmada önemli şekilde artış göstermiştir. Bu bulgu çalışmada öncelikli olarak hedeflenen iskemi-reperfüzyon hasarının gerçekleştiğini göstermektedir. Bununla birlikte iskemi reperfüzyon öncesi 3 hafta süreli çinko ve melatoninin periton içi olarak ayrı ayrı ve kombine uygulanması ise ilgili doku ve kanda oluşan oksidatif hasarı belirgin şekilde önlediği de yine antioksidan savunma sistemlerinden birisi olan glutatyon düzeylerinin hem böbrek dokusu hemde eritrositlerdeki artışıyla ortaya konulmuştur.

Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda farklı dokulara iskemi-reperfüzyon için değişik zaman aralıkları uygulanmıştır. Nitekim daha önce yapılan bir çalışmada bu süre böbrek için 15-20 dakika olarak yapılmıştır (Tapuria ve ark 2008).

Lipitler, oksidasyon belirleyicisi olarak en çok çalışılan ve SOR'ların reaksiyona girebildiği ortak bir substrattır. Oksidasyon sonrası özellikle hücresel zarların lipitlerinde meydana gelen peroksidasyon sonucunda son ürün olarak malondialdehit (MDA), konjuge dienler, kısa zincirli alkenler ve lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Dokuda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak farklı metodlar kullanılmaktadır. Bu metodların en çok kullanılanlardan biri de dien konjugatları olan malondialdehit tayinidir. Bizim çalışmamızda da lipid peroksidasyonun göstergelerinden birisi olan MDA değerleri böbrek dokusuyla birlikte plazmada incelendi. Bu parametrenin özellikle iskemi-reperfüzyon yapılan grupta önemli şekilde artış göstermiş olması daha önceki çalışmalarda elde edilen artmış MDA değerleri ile paralellik göstermektedir (Şener ve ark 2005). Benzer şekilde gerçektirilen böbrek iskemi reperfüzyon çalışmalarında lipid peroksidasyonunun belirteçlerinden olan MDA değerlerinin önemli şekilde artış gösterdiği rapor edilmiştir (Aktoz ve ark 2007, Atılgan ve ark 2012, Ahmadiasl ve ark 2013, Ahmadiasl ve ark 2014). Çalışmamızda iskemi reperfüzyon uygulamasının yanı sıra bu uygulama öncesi 3 hafta süreli çinko ve melatoninin ayrı ayrı ve beraber takviyesinin iskemi-reperfüzyondaki etkisini belirlemek için böbrek dokusu ve

plazmadaki MDA değerleri incelenmiştir. Bu parameternin özellikle iskemi-reperfüzyon grubunda kontrol değerlerinden yaklaşık iki buçuk katı oranında artış göstermiştir. Ancak çinko ve melatonin takviyesi yapılan gruplar ile kontrol grubunun MDA değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Bu durum sıçanlarda 45 dakika süreli iskemi ve takiben 1 saat süreyle reperfüzyon yapılmasıyla oluşan oksidatif hasarın önceden çinko ve melatonin uygulamasıyla belirgin şekilde baskılandığını ortaya koymaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda çinko ve melatoninin farklı organlarda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oluşan oksidatif hasarı azalttığı rapor edilmiş olup elde ettiğimiz bulguları destekler mahiyettedir (Mahbooba ve Siddiquib 2002, Baltacı ve ark 2004, Nair ve ark 2005, Ahmadiasl ve ark 2013, Ahmadiasl ve ark 2014). Boran ve Özkan (2004) ratlarda yaptıkları deneysel çalışmada hasara uğramış testislere çinko aspartat uygulamasının etkisini değerlendirmişler, sonuç olarak çinko aspartat ön tedavisinin iskemi-reperfüzyon hasarını antioksidan etkisi ile azalttığını ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda ise periton içi uygulanan çinko sülfat iskemi-reperfüzyon hasarına karşı böbrek dokusunda önemli bir koruyucu etki oluşturması yukarıda bahsedilen bulgulara paralellik göstermektedir. Çinko ile yapılan değişik çalışmalarda genellikle iskemi-reperfüzyon hasarına karşı tedavi edici sonuçların elde edilmesi bizi bu çalışmayı yapmaya karşı teşvik edici bir faktör olmuştur (Koyuncu 2009). Koyuncu'nun (2009) yaptığı çalışmada da sinir dokusunda oluşturulan kompresyon iskemisi sonucu oluşan hasarın önlenmesinde çinko aspartat kullanılarak bunun etkileri biyokimyasal olarak değerlendirmişler ve endojen antioksidanlar olan CAT, SOD, GPX değerleri çinko aspartat uygulanan gruplarda artmış, MDA düzeyleri ise azalmış, bu da çinkonun antioksidan özelliği ile ilişkilendirmişlerdir.

Benzer şekilde güçlü bir antioksidan olan melatonin bu çalışmada 3 mg/kg/gün olarak 3 hafta süreyle uygulanmış ve uygulamaya bağlı olarak iskemi-reperfüzyonun oluşturduğu oksidatif hasarın göstergesi olan MDA seviyelerini hem çalışılan dokuda hem de plazmada önemli şekilde azalma göstermiştir. Elde edilen bu bulgular melatonin güçlü antioksidan etkisinin çalıştığımız bu böbrek iskemi-reperfüzyon modeli de gerçekleştiğini ortaya koymuş olan bu konuyla benzer şekilde gerçekleştirilen çalışmalarla paralellik göstermektedir (Mayo ve ark 2003, Sanchez-Hidalgo ve ark 2009, Ishii ve ark 2009, Farías ve ark. 2012).

Çalışmamızda antioksidan sistemin göstergesi olarak da glutatyon düzeyleri çalışılan böbrek dokusu ve eritrositlerde belirlenmiştir. Bu parametrenin eritrositdeki miktarı melatonin takviyesi yapılan grupta en yüksek olarak belirlendi. Ancak iskemi reperfüzyon grubunda dokudaki GSH düzeyi artarken eritrositdeki mikarı azalma göstermiştir. İskemi-reperfüzyona bağlı olarak dokuda yükselmiş olan GSH düzeylerinin ilgili dokunun oksidatif hasara karşı ortaya koyduğu antioksidan sistem aktivitesindeki artıştan kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada böbrek yaralanmasına bağlı olarak dokudaki GSH düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (Ebrahimi ve ark 2013). Ancak aksine olarak gerçekleştirilen başka bir deneysel çalışmada ise sıçanlarda böbrek iskemisine bağlı olarak doku GSH düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir (Sezgin ve ark 2013). Bizim çalışmamızda ise doku GSH düzeyleri iskemi reperfüzyona bağlı olarak arterken eritrosit GSH seviyelerinde önemli azalmalar belirlendi. Başka bir deneysel araştırmada ise sıçanlarda böbrek iskemi reperfüzyon hasarında ilgili dokudaki GSH seviyelerinin önemli bir değişiklik göstermediği tespit edilmiştir (Altintas ve ark 2013). İlgili çalışmalardan görüldüğü üzere dokudaki GSH düzeylerinde farklı bulgular elde edilmiştir. Elde edilen bu verilerdeki farklılıkların deneysel modellerdeki farklılıklardan kaynaklanmış olması muhtemeldir. Araştırmada iskemi-reperfüzyon öncesi deney hayvanlarına 3 hafta süreyle çinko ve melatoninin beraber ve ayrı olarak takviyesi doku ve eritrosit GSH seviyelerinde önemli artışlara yol açmıştır. Ancak melatonin takviyesiyle oluşan eritrosit GSH düzeylerindeki artışlar çinko uygulamasına göre daha yüksek oranda gerçekleşmiştir. Nitekim daha önce gerçekleştirilen benzer çalışmalarda çinko uygulamasının böbrek iskemi-reperfüzyon hasarını direk olarak düzelttiği (Oksuz ve ark 2009) veya çinkonun yapısına katıldığı antioksidan enzimler aracılığıyla bu etkiyi gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Seok ve ark 2008, Yu ve ark 2006). Bizim çalışmamızda 3 haftalık çinko uygulamasıyla elde ettiğimiz artmış GSH düzeyleri yukarıda bahsedilen bulgularla benzerlik göstermektedir. Araştırmamızın bir grubunda ise iskemi-reperfüzyon öncesi 3 hafta süreli, melatonin uygulaması yapılarak iskemi-reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu grupta uygulanan melatonin antioksidan olan GSH seviyelerini özellikle eritrositlerde önemli şekilde artırdığı belirlenmiştir. Melatonin çoğu fizyolojik süreçler ve hastalıklara ilişkili olan oldukça güçlü antioksidan ve serbest radikal temizleyici özelliğe sahip olan bir molekül olup vücutta böbreği de içeren farklı dokularda reseptörleri bulunur (Sanchez-Hidalgo ve ark 2009, Peliciari-Garcia

ve ark 2011). Daha önce gerçekleştirilen değişik böbrek iskemi-reperfüzyon çalışmalarında melatonin takviyesinin doku koruyucu etkisi rapor edilmiştir (Sener ve ark 2002, Atılgan ve ark 2012, Ahmadiasl ve ark 2014). Araştırmada ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarına karşı korunmada çinko ve melatoninin kombine etkisi de incelenmiştir. Her iki molekülün kombine uygulamasına bağlı olarak antioksidan olan GSH düzeyleri arterken, bu artış ilgili moleküllerin tek başına kullanımlarına göre önemli bir farklılık oluşturmamıştır.

Çalışmada ilgili dokudaki oksidatif hasar ve antioksidan savunma mekanizmalarının belirlenmesine ilave olarak histopatolojik yönden de doku değerlendirilmiştir. Böbrek dokusu incelendiğinde özellikle iskemi-reperfüzyona bağlı olarak korteks tubüler yapılarında düzleşme ve tubüler incelme belirgin şekilde ortaya çıkarken, iskemi-reperfüzyon öncesi çinko ve melatonin takviyesi ortaya çıkan bu patolojik değişimleri belirgin şekilde önlemiştir. Daha önce gerçekleştirilen benzer çalışmalarda böbrekte iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı olarak farklı düzeylerde histopatolojik değişiklikler oluştuğu belirlenmiştir (Kaneko ve ark 2012, Koga ve ark 2012, Kaushal ve ark 2013). Oksüz ve ark (2009) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sıçanlarda laporaskopiyle oluşan renal hasarın cerrahi uygulama öncesi tek doz 50 mg/kg dozda çinko takviyesiyle önlendiği ortaya konulmuştur. Yapılan başka bir çalışmada ise iskemi sonucu azalan çinkonun daha fazla hasara yol açtığı rapor edilmiştir (Yu ve ark 2006). Çinkonun diabette böbrek hasarı üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise bu elementin eksikliğinin böbrekte oluşan hasarı daha ileri düzeye ulaştırırken 3 ay süreli takviyesinin ise ilgili dokuda oluşan hasarı belirgin şekilde önlediği rapor edilmiştir (Li ve ark 2009). Tuzcu ve ark (2010) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise çinko pikolinat uygulamasının sıçanlarda cisplatin ile oluşan böbrek hasarına karşı koruyucu etkisi belirlenmiştir. Bizim araştırmamızda ise, sıçanlarda deneysel iskemi (45 dakika)-reperfüzyon (60 dakika) hasarında böbrek dokusunda önemli histopatolojik değişimler belirlenirken tedavi amacıyla iskemi-reperfüzyon öncesi 3 hafta boyunca 3 mg/kg/gün olarak çinko sülfat uygulaması böbreklerde iskemi-reperfüzyona bağlı olarak meydana gelen %70 oranındaki tubüler düzleşme ve tubüler inceleme ile %40 civarındaki vakuolizasyon ve triodizasyonu %10 seviyelerine kadar düşürürken, oluşan yangıyı da önlemiştir. Bu bulgular yaptığımız çinko tedavisinin böbreklerde oluşan histopatolojik değişimleri düzeltici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmanın 4. grubunda İ/R öncesi 3 mg/kg/gün olarak periton içi melatonin takviyesi yapılmış olup bu grupta da böbreklerde oluşan histopatolojik değişimler bu tedavi ile önlenmiştir. Oluşan histopatolojik değişimlerin önlenme düzeyi melatonin takviyesi yapılan 4. Grupta, çinko uygulamasının yapıldığı 3. grupla benzer düzeyde tespit edildi. Bizim araştırmamıza benzer şekilde gerçekleştirilen çalışmalarda melatonin takviyesinin böbreklerde oluşan tubüler epitelyum bozulmasını (Ahmadiasl ve ark 2013) ve nekrozu önlediği (de Souza ve ark 2014) tespit edilmiştir. Çinko ve melatonin beraber uygulandığı deney grubunda da yine bu moleküllerin histopatolojik değişimleri düzeltici etkisinin tek başına kullanımlarıyla benzer şekilde gerçekleştiği tespit edildi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mevcut çalışmanın bulguları ilk olarak sıçanlarda böbrek dokusunda 45 dakika süreli iskemi ve takiben 60 dakika süreli reperfüzyona bağlı olarak ilgili dokuda ve kanda lipid peroksidasyonun belirgin olarak arttığını göstermektedir. Böbreğin bu hasara karşı koymak adına antioksidan sistemini aktive ettiği ancak bu aktivite artışının oluşan lipid peroksidasyonunu önleyemediğini göstermektedir. Bununla birlikte iskemi-reperfüzyon öncesi üç hafta süreli 3 mg/kg/gün dozunda çinko ve melatoninin ayrı ayrı ve beraber uygulamasının böbreklerde oluşan lipid peroksidasyonu antioksidan sistemin göstergelerinden olan GSH düzeylerini artırmak suretiyle önlediği belirlenmiştir. Ayrıca ilgili dokuda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkan histopatolojik değişimlerde bahsedilen tedavi ile önlenmiştir.

Araştırmadan elde edilen verilere göre böbrekte iskemi ve reperfüzyon hasarı oluşturma ihtimali olan vakalarda önceden çinko ve melatoninin tek başına veya kombine olarak uygulamasının bu dokuda koruyucu etki sağlayabileceğini göstermektedir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sıçanlarda Deneysel Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında Çinko ve Melatonin Etkisi

Mine YILMAZ

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2014

Böbrek iskemi-reperfüzyonunda oluşan oksidatif stres direkt olarak glomerular ve tubüler epitelyumu etkiler. Oksijen serbest radikaller renal iskemi-reperfüzyon yaralanmasının patofizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Mevcut çalışmanın amacı sıçanlarda deneysel olarak böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında 3 hafta süreli çinko, melatonin ve çinko + melatonin takviyesinin doku ve plazmadaki malondialdehid (MDA) ile eritrosit ve dokudaki glutatyon (GSH) düzeyleri ve böbrek histolojine olan olan etkisini belirlemekti.

Çalışma ağırlıkları ortalama 250 gr olan erkek Wistar albino ratlar üzerinde gerçekleştirildi. Deney grupları şu şekilde oluşturuldu. 1-Kontrol, 2-Sham, 3-İskemi-Reperfüzyon, 4-Çinko + İskemi-Reperfüzyon, 5- Melatonin+ İskemi-Reperfüzyon, 6-Çinko +Melatonin + İskemi-Reperfüzyon grubu. Çinko ve melatonin iskemi-reperfüzyon öncesi 3 mg/kg dozunda 3 hafta boyunca peritoniçi günlük olarak uygulandı. Renal iskemi-reperfüzyon genel anestezi yapılan hayvanlarda sol böbreklerin 45 dakika iskemi ve 1 saat reperfüzyonu şeklinde oluşturuldu. Uygulamanın bitiminde öldürülen hayvanlardan alınan kan ile böbrek dokusundaki MDA ve GSH seviyeleri ile dokudaki histolojik değişiklikler belirlendi.

Böbrek dokusu ve eritrositlerde GSH değerlerinin çinko ve melatonin takviyesi yapılan gruplarda yükseldiği tespit edildi ($P<0.005$). Böbrek dokusu ve plazmadaki MDA değerleri incelendiğinde iskemi sonucu bu parametrede çok önemli artış olurken, çinko ve melatonin takviyesi MDA değerlerini normal seviyeye düşürdü ($P<0.002$). İskemi-reperfüzyon böbrek dokusunda tubüler düzleşme ve incelme ile vakuolizasyon, triodizasyon ile yangıya neden oldu.

Bu çalışmanın sonuçları sıçanlarda böbrek dokusunda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oksidatif hasarın arttığını, bununla birlikte iskemi-reperfüzyon öncesi yapılan çinko ve melatonin takviyesinin oksidatif hasarı belirgin şekilde önlediğini göstermektedir. İskemi-reperfüzyonla oluşan histopatolojik değişimlerin çinko ve melatonin tedavisiyle önlendiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Böbrek iskemi-reperfüzyonu, çinko, melatonin, lipid peroksidasyon, rat

7. SUMMARY

The effects of Zinc and Melatonin on Experimental Renal Ischaemi-Reperfusion Damage in Rat

Oxidative stres during the renal ischaemi-reperfusion affect directly glomeruler and tubuler epitelium. Oxygen free radicals have roles in pathophysiology of renal ischaemi-reperfusion injury. The aim of present study was determined to the effects of 3 weeks zinc, melatonin or zinc plus melatonin on plasma and tissue malondialdehyde (MDA) and eryhtrocyte and tissue glutathione levels and renal histology.

Experiments were held on the Wistar-albino rats which mean body weight 250 gr. Groups were design as 1-Control, 2-Sham, 3-Ischaemi-Reperfusion, 4- Zinc + Ischaemi-Reperfusion, 5-Melatonin + Ischaemi-Reperfusion, 6-Zinc + Melatonin + Ischaemi-Reperfusion. Zinc and melatonin were supplemented as 3 mg/kg/day by intraperitoneally. For the renal ischaemi-reperfusion animals were anesthesized and left kidneys ischaemized and reperfused 45 and 60 minutes, respectively. Following that mentioned procedure animals were killed and MDA and GSH samples analyzed in renal tissue and blood and also histopathologic evaluation was done.

GSH levels were increased in zinc and melatonin supplemented groups ($P<0.005$). Tissue and plazma MDA levels were increased in ischaemi-reperfusion group, however, zinc and melatonin supplementation prevented increases of MDA ($P<0.002$). Ischaemi-reperfusion led to tubuler flatten and thinning, vacualisation, triodisation and inflamation.

The results of present study show that in renal tissue oxidative damage increase because of ischaemi-reperfusion, however, zinc and melatonin supplementation before the ischaemi-reperfusion prevents oxidative damage significantly. Histopathogical changes due to ischaemi-reperfusion prevents by zinc and melatonin treatment.

Key words: Lipid peroxidation, melatonin, rat, renal ischaemi-reperfusion, zinc.

8. KAYNAKLAR

1. Acworth IN, Bailey B. Reactive Oxygen Species. In: The handbook of oxidative metabolism. Massachusetts: ESA Inc; 1997.p. 1-4.
2. Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemmati A. Combination antioxidant effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Iran J Basic Med Sci, 2013; 16(12):1209-16.
3. Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemati A, Baradaran B, Azimian E. Effect of a combined treatment with erythropoietin and melatonin on renal ischemia reperfusion injury in male rats. Clin Exp Nephrol, 2014 Feb 4.
4. Akgun S, Tekeli A, Isbir SC, Civelek A, Ak K, Sirvanci S, Arbak S, Yaylim I, Arsan S. FK506 to prevent lung injury after hindlimb ischemia and reperfusion ina rat model an electron micros copicstudy. Surg Today, 2004; 34(8):678-84.
5. Akkoç H. Miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı. Dicle Tıp Dergisi, 2008; 35 (3), 211-5.
6. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1.Baskı, Mimoza Yayınları, 1995; 1-60.
7. Akpolat M. Alkolün oluşturduğu serbest radikaller üzerine ibuprofen ve erusik asidin etkileri (tez). Edirne: TÜ Sağlık Bilimleri Enst, 2000.
8. Aktoz T, Aydogdu N, Alagol B, Yalcin O, Huseyinova G, Atakan IH. The protective effects of melatonin and vitamin E against renal ischemia-reperfusion injury in rats. 2007; 29 (5):535-42.
9. Altintas R, Polat A, Vardi N, Oguz F, Beytur A, Sagir M, Yildiz A, Parlakpinar H. The protective effects of apocynin on kidney damage caused by renal ischemia/reperfusion. 2013; 27 (5):617-24.
10. Altun A, Vardar A, Altun BU. Melatonin ve kardiyovasküler sistem. Anadolu Kardiyoloji Dergisi, 2001; 1:283-8.
11. Ankarcrona M, Dybukt M, Bonfoco E. Glutamate- induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptozis depending on mitochondrial function. Neuron, 1995; 15:961-73.
12. Arcasoy A. Çinko ve Çinko Eksikligi 2. Baskı: Ankara Talasemi Dernegi Yayınları İstanbul, 2002; 1-23.
13. Aruoma O, Kaur H, and Halliwell B. Oxygen free radicals and human diseases. The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health, 1991; 111:172-7.
14. Ateş B. İntestinal iskemi-reperfüzyon uygulamalarında değişik antioksidanların koruyucu etkilerinin araştırılması (tez). Malatya: İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2001.
15. Atılgan D, Parlaktas BS, Uluocak N, Erdemir F, Fırat F, Erkorkmaz U, Saylan O. Effects of melatonin on partial unilateral ureteral obstruction induced oxidative injury in rat kidney. Urol Ann, 2012; 4 (2):89-93.
16. Ault JG, Lawrance DA. Glutathione distubation in normal and oxidatively stressed cells. Exp Cell, 2003; 285: 9-14.
17. Aydıner ÇY, Pul M, İnan M, Bilgi S, Çakır E. Deneysel testiküler torsiyon modelinde N-asetilsistein doku hasarını önlemede rol oynayabilir mi? Cumhuriyet Tıp Derg, 2012; 34:462-71.
18. Aydoğdu N, Kanter M, Erbaş H, Kaymak K. Kadmiyuma bağlı karaciğer hasarında taurin, melatonin ve asetilsisteinin nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve bazı antioksidanlar üzerindeki etkileri. Erciyes Tıp Dergisi, 2007; 29:89-96.
19. Ballotori N, Hammond C L, Krance S M. Molecular mechanism of reduced glutathione transport: Role of the MRP/ CFTR / ABCC and OATP / SCL21A families of membrane proteins. Toxicol App Pharmacol, 2005; 204:238-55.
20. Baltacı AK, Sunar F, Mogulkoc R, Oztekın E.Effect of zinc deficiency and supplementation on lipid peroxidation of renal tissue in overiectomized rats. Biol Trace Elem Res, 2004; 101:231-9.
21. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Am Pharm, 1994; 9:26-35.
22. Barceloux DG. Zinc. Clin. Toxicol, 1999; 37:279-92.
23. Barry MC, Wang JH, Kelly CJ, Sheehan SJ, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Plasma factors augment neutrophil and endothelial cell activation during aortic surgery. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997; 13:381-7.
24. Bayramiçli M. Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri. 2005; 227-8.

25. Beyersmann D. Homeostasis and cellular functions of zinc. Matt Wiss U Werkstofftech, 2002; 33: 764-9.
26. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002; 11(3):301-8.
27. Bonventre JV, Yang L J. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. Clin Invest, 2011; 121(11):4210-21.
28. Boran C, Özkan KU. The effect of zinc therapy on damaged testis in pre-pubertal rats. Pediatr Surg Int, 2004; 20(6):444-8.
29. Bornman MS, Oosthuizen JMC, Barnard HC. Melatonin and sperm motility. Andrologia, 1989; 483-5.
30. Boyunaga H, Çelik C. Serbest radikaller ve hücresel denge. Bilim Teknik Dergisi, 1996; 347:98-100.
31. Bray TM, Bettger WJ. The phsiological role of zinc as an antioxidant. Free Radic Biol Med, 1990; 8:281-91.
32. Brezezinski A. Melatonin in humans. N Engl J Med, 1997; 336:186-95.
33. Brezenzinski A, Seibel MM, Lynch HJ. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. J Clin Endocrinol Metab, 1987; 64:865-7.
34. Cadenas E. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: Ahmad S editor. Oxidative stress and antioxidant defences in biology. New York: Chapman and Hall, 1995;4-47.
35. Carecani P, Rosenbulum ER, Van Thiel DH. Reoxigenation Injury in Isolated Rat Hepatocytes: Relation to Oxigen Free Radicals and Lipid Peroxidation. Am J Physiol, 1994; 266-806.
36. Carrilo VA, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia MS, Reiter RJ. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine and/or paracrine substance. FASEB, 2004; 18:537-9.
37. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. Chemistry and Physics of Lipids, 2009; 157, 1-11.
38. Ceran C, Sönmez K, Türkyılmaz Z, Demirogulları B, Dursun A, Düzgün E, Başaklar AC, Kale N. Effect of bilirubin in ischemia/reperfusion injury on rat small intestine. J Pediatr Surg, 2001; 36 (12):1764-7.
39. Chalmers- Redman R, Franser AD, Ju W. Mechanisms of nerve cell death: Apoptosis or necrosis after cerabral ischemia, Neuroprotective agents and cerabral ischemia. Academia Press Lmt, 1997; 2-25.
40. Chamoun F, Burne M, O' Donnel M, Rabb H. Pathophsiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. Front Biosci, 2000; 5:103-9.
41. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2007; 376:1-43.
42. Chen Y, Milles AM, Grisham BM. Pathophysiology and reactive oxygen metabolites. In: Ahmad S editors. Oxidative stess and antioxidant defenses in biology. 1th ed. New York: Chapman and Hall Co, 1995; p.62-95.
43. Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. Curr Med Chem, 2008; 15:1236-48.
44. Cheung RT, Tipoe GL, Tam S, Ma ES, Zou LY, Chan PS. Preclinical evaluation ofpharmacokinetics and safety of melatonin in propylene glycol for intravenous administration. J Pineal Res, 2006; 41:337–43.
45. Clarke PG. Devolopmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. Anat Embryol, 1990; 181:195-213.
46. Concannon MJ, Kester CG, Welsh CF, Puckett CL. Patterns of free-radical production after tourniquet ischemia: implications for the hand surgeon. Plast Reconstr Surg, 1992; 89:846-52.
47. Conte D, Narindrasorasak S, Sarkar B. In vivo and in vitro iron replaced zinc finger generates free radicals and causes DNA damage. J Biol Chem, 1996; 271:5125-30.
48. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Temel patoloji. Çevikbaş U (Çeviren) 5. Baskı. İstanbul: Nobel ve Yüce, 1995.
49. Cousins JR. Absorbtion, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: Speacial reference to metallothionein and ceruloplasmin. Phys Rev, 1985; 65:238-309.
50. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmalogical action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. Eur J Pharmacol, 2001; 426:1-10.

51. Çağlayan O, Çağlayan F, Günel E, İntestinal iskemi-reperfüzyonun doku çinko düzeyine etkisi. Genel Tıp Dergisi. 1998; 8:9.
52. Da Silva EL, Piskula M, Terao J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of epicatechin. Free Radical Biology & Medicine, 1998; 24:1209-16.
53. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russel GI. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. Exp Nephrol, 1995; 3:348-54.
54. De Souza AV, Golim MA, Deffune E, Domingues MA, de Carvalho LR, Vianna IG, Castiglia YM, Vianna PT. Evaluation of Renal Protection From High Doses of Melatonin in an Experimental Model of Renal Ischemia and Reperfusion in Hyperglycemic Rats. Transplant Proc, 2014 May 15.
55. Delabar JM, Nicole A, D'Auriol L, Jacob Y, Meunier-Rotival M, Galibert F, Sinet PM, Jérôme H. Cloning and sequecing of a rat CuZn Superoxide dismutase Cdna. Eur J Biochem, 1987; 166: 181-7.
56. Delrio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutiriton, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 2005; 15:316-28.
57. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiol metabolism. Biochem Pharmacol, 2002; 64:1019-26.
58. Donnahoo KK, Meldrum DR, Shenkar R, Chung CS, Abraham E, HarkenAH. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NFkappaB and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney. J Urol, 2000; 163, 1328-32.
59. Dosluoglu HH, Aktan AO, Yegen C, Okboy N, Yalcm AS, Yahn R. The cytoprotective effects of verapamil and iloprost (ZK 36374) on ischemia/reperfusion injury of kidneys. Transpl Int, 1993; 6:138-42.
60. Drazen DL, Bilu D, Bilbo SD, Nelson RJ. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001; 280:1476- 82.
61. Ebrahimi A, Salimi F, Safaei M, Melali H, Jazi AH, Nematbakhsh M, Mokhtari N, Rasooli H. How effective are alprostadil and hydrocortisone on reperfusion injury in kidney after distant organ ischemia? J Res Med Sci, 2013; 18(9):755-8.
62. Edwards JC, Chapman D, Cramp WA. The effects of ionizing radiation on biomembrane structure and function. Prog Biophys Mol Biol, 1984; 43, 71-93.
63. El-kossi A, Abdellah M, Rashad A, Hamed S. The effectiveness of eveningprimrose oil and alpha lipoic acid in recovery of nerve function in diabetic rats. J Clin Exp Invest, 2011; 2, 245-53.
64. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959; 82:70–7.
65. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull, 2004; 70:71-86.
66. Ernster L. Biochemistry of Reoxigenation Injury. Crit Care Med, 1988; 16:947-53.
67. Farías JG, Zepeda AB, Calaf GM. Melatonin Protects the Heart, Lungs and Kidneys from Oxidative Stress under Intermittent Hypobaric Hypoxia in Rats. Biol Res, 2012; 45:81-5.
68. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M. Effects of Ischemia and Reperfusion on Liver Regeneration in Rats. Eur I Surg, 1993; 159:393-8.
69. Fourtillan JB, Brisson AM, Fourtillan M, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. Am J Physiol Endocrinol Metabol, 2001; 280:11-22.
70. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. Thromb Haemost, 2007; 97:738-47.
71. Fu HW, Moomaw JF, Moomaw CR, Casey PJ. Identification of cysteine residue essential for activity of protein farnesyl transferase, Cys 299 is exposed only upon removal of zinc from the enzym. J Biol Chem, 1996; 271:2841-8.
72. García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. Vascul Pharmacol, 2008; 48:109-14.
73. Germann G, Drucke D, Steinau HU. Adhesion receptors and cytokine profiles in controlled tourniquet ischaemia in the upper extremity. J Hand Surg, 1997; 6: 778-82.
74. Gibbs PNB, Gore MG, Jordan PM. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in humans: Aminolevulinate dehydratase. Biochem J, 1985; 225:573-80.
75. Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, Fulia F, Barberi I. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin

C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. J Pharm Pharmacol, 2001; 53:1393–401.
76. Golab F, Kadkhodaee M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R, Zahedi K, Lentsch AB, Soleimani M. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. Kidney International, 2009; 75 (8):783-92.
77. Grisham MB, Granger DN. Free radicals: reactive metabolites of oxygen as mediators of postischemic reperfusion injury. In: Martson A, Bulkley GB, Fiddian-Green RG, Haglund U, editors. Splanchnic ischemia and multiple organ failure. St Louis: Mosby, 1989a:135-44.
78. Grisham MB, Granger DN. Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia and reperfusion. Clin Chest Med, 1989b; 10:71-81.
79. Guppy M, Abas L, Arthur PG, Whisson ME. The Pasteur effect in human platelets: implications for storage and metabolic control. Br J Haematol, 1995; 91(3):752-7.
80. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. Mol Cell Biochem, 1998; 179:169-87.
81. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. Trends Neurosci, 1992; 8: 22-6.
82. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999; 246-350.
83. Hassoun HT, Grigoryev DN, Lie ML, Liu M, Cheadle C, Tuder RM, Rabb H. Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2007; 293(1):30–40.
84. Herbert KJ, Hickey MJ, Lepore DA, Knight KR, Morrison WA, Stewart AG. Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischaemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle. Eur J Pharmacol, 2001;424:59-67.
85. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. Am J Physiol, 1987; 253(3 Pt 2): 699-703.
86. Homer Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997;14:195-203.
87. Hotchkiss AK, Nelson RJ. Melatonin and immune function: Hype or hypothesis? Crit Rev Immunol, 2002; 22:351-71.
88. Hwang WYK, Koh LP, Ng HJ, Tan PHC, Chuah CTH, Fook SC, Chow H, Tan KW. A randomized trial of amifostine as a cytoprotectant for patients receiving myeloablative therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Hepatology, 1986; 5:388-95.
89. Ishii H, Sato S, Yin C, Sakuma Y, Kato M. Cetrorelix, a gonadotropin-releasing hormone antagonist, induces the expression of melatonin receptor 1a in the gonadotropin- releasing hormone neuronal cell line GT1-7. Neuroendocrinology, 2009; 90(3):251-9.
90. İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical Mechanism and Tissue Injury of Cerebral Ischemia and Reperfusion Part II: Tissue Injury. Journal of Neurological Sciences (Turkish). Norol Bil D, 2000; 17:2.
91. Jaeschke H. Moleculer mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003; 125:917-36.
92. Kandilci HB, Gümüşel B. Akciğerlerde iskemi-reperfüzyon hasarı ve iskemik önkoşullanma. Hacettepe Üniversitesi. Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2005; 25:35.
93. Kaneko T, Shimizu A, Mii A, Fujita E, Fujino T, Kunugi S, Du X, Akimoto T, Tsuruoka S, Ohashi R, Masuda Y, Iino Y, Katayama Y, Fukuda Y. Role of matrix metalloproteinase-2 in recovery after tubular damage in acute kidney injury in mice. Nephron Exp Nephrol, 2012; 122 (1-2):23-35.
94. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies APMIS, 2007; 115:81-103.
95. Kaushal GP1, Haun RS, Herzog C, Shah SV. Meprin A metalloproteinase and its role in acute kidney injury. Am J Physiol Renal Physiol, 2013; 304 (9):150-8.
96. Kavaklı A, Acet A, Parlakpınar H, Akpolat N, Şahna A. Ratlarda Beyin İskemi–Reperfüzyonu Sonucu Oluşan Morfolojik Değişikliklere Melatonin ve Pinealektoni'nin Etkisi. FÜ Sağ Bil Derg, 2007; 21: 63–6.
97. Kazez A, Demirbağ M, Üstundağ B, Özercan IH, Sağlam M. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. J Pediatr Surg, 2000; 35 (10):1444-8.
98. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol, 1993; 23(1):21-48.

99. Kennaway DJ, Voultsios A. Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. J Clin Endocrinol Metab, 1998; 83:1013-5.
100. Kharbanda RK, Peters M, Walton B, Kattenhorn M, Mullen M, Klein N, Vallance P, Deanfield J, MacAllister R. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. Circulation, 2001; 103:1624-30.
101. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, 2002; 33(2):110-8.
102. Kilic U, Yilmaz B, Ugur M, Yuksel A, Reiter RJ, Hermann DM, Kilic E. Evidence that membrane-bound G protein-coupled melatonin receptors MT1 and MT2 are not involved in the neuroprotective effects of melatonin in local cerebral ischemia. J Pineal Res, 2012; 52: 228–35.
103. Kılıç E, Tuzcu Z, Tuzcu M, Özercan İH, Yılmaz Ö, Şahin F, Şahin K. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. Nutrition & Metabolism, 2013; 10:7.
104. Kilgore KS, Lucchesi BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: The role of free radicals and the inflammatory response. Clin Biochem, 1993; 26:359-70.
105. Klug A, Rhodes D. Zinc fingers: A novel protein motif for nucleic acid recognition. TIBS, 1998; 7:464-73.
106. Knight KR, Angel MF, Lepore DA, Abbey PA, Arnold LI, Gray KA, Mellow CG, O'Brien BM. Secondary ischaemia in rabbit skin flaps: the roles played by thromboxane and free radicals. Clin Sci, 1991; 80:235–40.
107. Koçak G, Erbil KM, Özdemir I, Aydemir S, Sunar B, Tuncel M, Atalay S. The protective effect of melatonin on adriamycin-induced acute cardiac injury. Can J Cardiol, 2003; 19:535-41.
108. Koga H, Hagiwara S, Kusaka J, Goto K, Uchino T, Shingu C, Kai S, Noguchi T. New α-lipoic acid derivative, DHL-HisZn, ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. J Surg Res, 2012; 174 (2):352-8.
109. Kondoh M, Imada N, Kamada K, Tsukahara R, Higashimoto M, Takiguchi M, Watanabe Y, Sato M. Property of metallothionein as a Zn pool differs depending on the induced condition of metallothionein. Toxicol Lett, 2003; 142:11-8.
110. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of i schemic-tissue/reperfusion. Clin Cardiol, 1993; 16:19-26.
111. Koyuncu Y. Rat siyatik sinirinde oluşturulan kompresyon hasarına çinko aspartatın etkisinin araştırılması (Uzmanlık tezi). Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 2009.
112. Kren V, Walterova D. Silybin and silymarin-new effects and new applications. Biomedical, 2005; 149:29-41.
113. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji. 2. baskı, İstanbul: Nobel tıp kitapevi, 1995; 4-8.
114. Kuş İ, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. T Klin J Med Sci, 2002; 22: 221-6.
115. Kücükakın B, Gögenur I, Rosenberg J. Melatonin against surgical stres. Ugeskr Laeger, 2007; 169 (14):1306-8.
116. Lapenna D, De Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Consoli A, Di Ilio C, Cuccurullo F. Hypochlorous acid- inuced zinc release from thiolate bonds; Apotential protective mechanism towarda biomolecules oxidant damage during inflamation. Free Radic Res, 1994; 20: 165-70.
117. Li Y, Bickel KD, Im MJ, Hu L, Dellon AL, VanderKolk CA, Manson PN. Effects of deferoxamine on ischemia/reperfusion injury after peripheral nerve compression. Ann Plast Surg, 1996; 36:365-9.
118. Li Z, Nickkholgh A, Yi X, Bruns H, Gross ML, Hoffmann K, Mohr E, Zorn M, Büchler MW, Schemmer P. Melatonin protects kidney grafts from ischemia/reperfusion injury through inhibition of NF-kB and apoptosis after experimental kidney transplantation. J Pineal Res, 2009; 46 (4):365-72.
119. Liebert J, Matlawska I, Bylka W, Murias M. Protective effect of aquilegia vulgaris on APAP induced oxidative stress in rats. J Ethnopharm, 2005; 97:351-8.
120. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. J Vasc Surg, 1990; 12:8-15.
121. Linkermann A, Bräsen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U, Krautwald S. Kidney Int, 2012; 81(8):751-61.

122. Longoni B, Salgo MG, Pryor WA, Marchiafava PL. Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. Life Sci, 1998; 62:853-9.
123. Lopez-Neblina F, Paez-Rollys AJ, Toledo-Pereyra LH. Mechanism of Protection of Verapamil by Preventing Neutrophil Infiltration in the Ischemic Rat Kidney. J SurgRes, 1996; 61:469-72.
124. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. Molecular Aspects of Medicine, 2009; 30:42-59.
125. Lu X, Hamilton JA, Shen J, Pang T, Jones DL, Potter RF, Arnold JM, Feng Q. Role of tumor necrosis factor-a in myocardial dysfunction and apoptosis during hindlimb ischemia and reperfusion. Crit Care Med, 2006; 34:484-91.
126. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, Canesi L, Papa S, Galli. Melatonin signaling and cell protection function. FASEB J, 2010; 24(10):3603–24.
127. Mahbooba M, Siddiquib MKJ. Long-term effects of a novel phosphorothionate (RPRII) on detoxifying enzymes in brain, lung and kidney rats. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002; 53:355–60.
128. Majno G. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overwiev of cell death. Am J Pathol, 1995; 146: 3-15.
129. Majsterek I, Gloc E, Blasiak J. A comparison of the action of amifostine and melatonin on DNA damaging effects and apoptosis induced by idarubicin in normal and cancer cells. J Pineal Res, 2005; 38:254-63.
130. Manera M, Serra R, Isaný G, Carpene E. Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. Journal of Fish Biology, 2000; 57: 457-65.
131. Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, HoopesJE. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. Ann Surg, 1983; 198:87–90.
132. Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Oxidative damage to catalase induced by peroxyl radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. Free Radic Res, 2003; 37:543–53.
133. McCord JM. Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. N Engl J Med, 1985; 312:159-63.
134. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med, 2000; 108:652-9.
135. Micha L, James A, William D, Susan J, Chunzhı D, Susan M, Heather S, Leslie M. Regional Pharmocokinetics Of Amifostine in Anesthetized Dogs: Role Of The Liver, Gastrointestinal Tract, Lungs, And Kidneys. Anti- cancer Drugs, 2002; 13:181-209.
136. Mickle DA, Weisel RD. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. Can J Cardiol, 1993; 9:89-93.
137. Miles KA. Measurement of tissue perfusion by dynamic computed tomography. Br J Radiol, 1991; 64 (761):409–12.
138. Mitchell RN, Cotran RS (Çeviri: U. Çevikbaş). Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (Eds.). Temel patoloji'de. 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi (WB Saunders Co), 2000; 3-24.
139. Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc and immunoresistance to infections in aging: New biological tools, trends. Pharmacol Sci, 2000; 21:205-8.
140. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. Fundam Clin Pharmacol, 2001; 15: 293-306.
141. Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR. Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. Plast Reconstr Surg, 1993; 92:1162–72.
142. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In. Armstrong D editor. Free radicals diagnostic medicine, New York:Plenum Press; 1994.
143. Murat K. Asetaminofen ile uyarılan karaciğer ve böbrek toksisitesi üzerine katekinlerin koruyucu etkisinin incelenmesi (Tez). Ankara: Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2010.
144. Nagano T, Yamamoto K, Matsumoto S, Okamoto R, Tagashira M, Ibuki N, Matsumura MK, Yabushita K, Okano N, Tsuji T. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis. J Clin Immunol, 1999; 19:422-7.
145. Nair N, Bedwal S, Prasad S, Saini MR, Bedwal RS. Short term zinc deficiency in diet induces increased oxidative stress in testes and epididymes of rats. Indian J Exp Biol, 2005; 43:786-94.
146. Negre-Salvayre A, Coatireux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. British Journal of Pharmacology, 2008; 153:6-20.

147. Niki E. Antioxidant in Relation to Lipid Peroxidation. Chem Phy Lipids, 1987; 44:227-53.
148. Nowak R, Mc Millen JC, Redman J. The correlation between serum and salivary melatonin concentrations and urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion rates: Two non-invasive techniques for monitoring human circadian rhythmicity. Clin Endocrinol (Oxf), 1987; 27: 445-52.
149. Oksuz H, Bulbuloglu E, Senoglu N, Ciralik H, Yuzbasioglu MF, Kilinc M, Dogan Z, Goksu M, Yildiz H, Ozkan OV, Atli Y. Re-protective effects of pre- and post-laparoscopy conditioning, zinc, pentoxifylline, and N-acetylcysteine in an animal model of laparoscopy-induced ischemia/reperfusion injury of the kidney. Ren Fail, 2009; 31(4):297-302.
150. Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A, Ifllekel H, Canyilmaz M, Mavioğlu O, Kizildağ S, Unlü G, Elar Z. Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilPateral lower limb ischemia reperfusion. Acta Anaesthesiol Scand, 2006; 50:150-5.
151. Ophir A, Berenshtein E,Kitrossky N, Averbukh E. Protection of the transiently ischemic cat retina hy zinc-desferrioxamine. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994; 35:1212-22.
152. Öz E, İlhan MN. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. Mol Cell Biochem, 2006; 286:11-5.
153. Özel Y. Ratlarda karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında grape seed proanthocyanidinin koruyucu etkilerinin incelenmesi (Uzmanlık tezi). Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 2006.
154. Palaoğlu OS, Beşkonaklı E. Pineal bez ve yaşlanma. Geriatri, 1998; 1:13-8.
155. Pardridge WM, Meitus LJ. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. J Neurochem, 1980; 34:1761-3.
156. Parks DA and Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol, 1986; 250:749-53.
157. Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. Hepatology. 1995; 21:1725-41.
158. Peliciari-Garcia RA, Zanquetta MM, Andrade-Silva J, Gomes DA, Barreto-Chaves ML, Cipolla-Neto J. Expression of circadian clock and melatonin receptors within cultured rat cardiomyocytes. Chronobiol Int, 2011; 28 (1):21-30.
159. Petrasek PF, Walker PM. A clinically relevant small-animal model of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. J Invest Surg, 1994; 7:27–38.
160. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. J Invest Surg, 2009; 22:46-55.
161. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. Methods in Enzymology, 1984; 105:273-82.
162. Prasad AS, Bao B, Beck FW, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans, Free Radical Biology and Medicine, 2004; 37:1182-90.
163. Prasad AS. Zinc in human health: An update. J Trace Elem Exp Med, 1998; 11:63-87.
164. Powell SR, Aluto L, Hall D, Tortolani AJ. Zinc supplementation enchances the effectiveness of St. Thomas' hospital No.2 cardioplegic solution in an in vitro model of hypothernic cardiac arrest. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995; 110:1642-8.
165. Powell SR, Hall D, Aluto L, Wapnir RA, Telehberg S, Tortolani AJ. Zinc improves postischemic recovery of isolated rat heartas through inhibition of oxidative stres. Am J Physiol, 1994; 266: 2497-507.P
166. Powell SR, Gurzenda EM, Wingertzohan MA, Wapnir RA, Promotion of copper excretion from the isolated perfused rat heart attenuates post ischemic cardiac oxidative injury. Am J Physiol, 1999; 277:956-62.
167. Powell SR. The antioxidant properties of zinc. J Nutr, 2000; 130:1447-54.
168. Pozo D, Delgado M, Fernandez SJM, Calvo JR, Gomariz RP, Martin L, Ortiz G G, Guerrero J M. Expression of Mel1a melatonin receptor mRNA in T and B subsets of lymphocytes from rat thymus and spleen. FASEB J, 1997; 11:466-73.
169. Preisler HD, Li B, Yang R. Supression of telomerase activity and cytokine messenger RNA levels, in acute myelogenous leukemia cell in vivo in patients by amifostine and interleukin 4. J Clin Invest, 2001; 101:746-54.
170. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. J Urol, 1997; 157:340-5.
171. Pucheu S, Coudray C, Tresallet N, Favier A, De-Leiris J. Effect of dietary antioxidant trace element supply on cardiac tolerance to ischemia-reperfüsion in the rat. J Mol Cell Cardiol, 1995; 27:2303-14.
172. Qaisiya M, Coda Zabetta CD, Bellarosa C, Tiribelli C. Bilirubin mediated oxidative stress involves antioxidant response activation via Nrf2 pathway. Cell Signal 2014 26(3): 512-20.

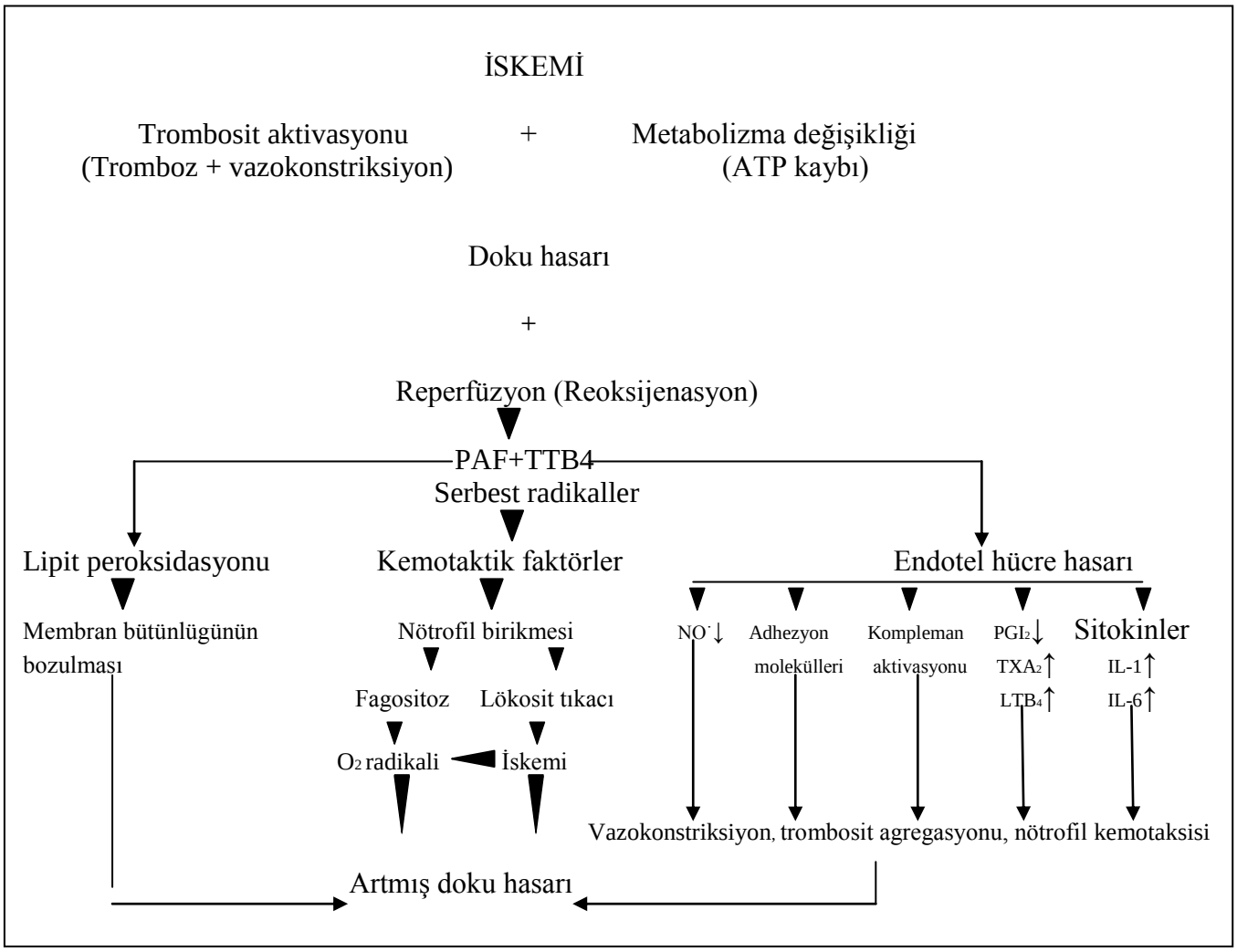
173. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys, 1991; 288:481-7.
174. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am J Surg, 1991;161:488-503.
175. Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radicalmediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. Ann N Y Acad Sci, 2001a; 939:200-15.
176. Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, QI W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. Ann N Y Acad Sci, 2000a; 917:376-86.
177. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh C-S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. Horm Metab Res, 1997; 29:363-72.
178. Reiter RJ, Maestroni JM. Melatonin in relation to the antioxidative defense and immune systems: possible implications for cell and organ transplantation. J Mol Med, 1999; 77:36-9.
179. Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. Mol Cell Endocrinol, 1991; 79:153-8.
180. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. J Pineal Res, 1995; 18:1-11.
181. Reiter RJ. Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. J Neural Transm, 1986; 21:35-54.
182. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. FASEB J, 1995; 9:526-33.
183. Reiter RJ, Tan DX, Leon J, Kilic U, Kilic E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. Exp Biol Med (Maywood), 2005; 230:104–17.
184. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: A review of the evidence. Cell Biochem Biophys, 2001b; 34, 237-56.
185. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. J Biomed Sci, 2000b; 7: 444-58.
186. Reppert SM. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein coupled receptors. J Biol Rhythms, 1997; 12:528-31.
187. Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. Trends Pharmacol Sci, 1996; 17:100-2.
188. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res, 2004; 36:1-9.
189. Ronen R L, Esther S. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms. Neuropotective opportunities, 2002; 39:55-73.
190. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Pharmacol Ther, 1988; 37: 231–49.
191. Rousseau A, Petren S, Planntin J. Serum and cerebrospinal fluid concentrations of melatonin: a pilot study in healthy male volunteers. J Neural Transm, 1999; 106:883-8.
192. Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. Am J Med, 2000; 108:567-74.
193. Sahna E, Parlakpinar H, Cihan OF, Turkoz Y, Acet A. Effects of aminoguanidine against renal ischaemia- reperfusion injury in rats. Cell Biochem Funct, 2004; 22.
194. Sahna E, Parlakpinar H, Ozturk F, Cigremis Y, Acet A. The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Urol Res, 2003; 31 (3):188-93.
195. Sanchez-Hidalgo M, De la Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvere A, Caballero B, Guerrero JM. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. Exp Gerontol, 2009; 44(5):328-34.
196. Saray A, Can B, Akbıyık F, Askar I. Ischemia-reperfusion injury of the peripheral nerve: An experimental study. Microsurgery, 1999; 19 (8):374-80.
197. Sastry PS, Subba KR. Apoptosis and the Nervous System. J Neurochem, 2000; 74:1-20.
198. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. Crit Care Med, 1993; 21 (9):1376-86.
199. Schoenberg MH, Beger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. Chem Biol Interact, 1990; 76 (2):141-61.
200. Schoenberg MH, Fredholm BB, Haglund U, Jung H, Sellin D, Younes M, Schildberg FW. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. Acta Physiol Scand, 1985; 124(4): 581-9.

201. Seekamp A, Warren JS, Remick DG, Till GO, Ward PA. Requirements of tumor necrosis factor-a and interleukin-1 in limb ischaemia/reperfusion injury associated with lung injury. Am J Pathol, 1993; 143:453-63.
202. Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention ofischemia-reperfusion injury. Mol Nutr Food Res, 2007; 51: 1345-52.
203. Sener G, Sehirli AO, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yeğen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. J Pineal Res, 2002; 32(2):120-6.
204. Seok YM, Kim J, Park MJ, Boo YC, Park YK, Park KM. Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san attenuates kidney fibrosis induced by ischemia/reperfusion in mice. Phytother Res, 2008; 22(8):1057-63.
205. Sewerynek E, Melchiorri DA, Chen L, Reiter RJ. Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. Free Radic Biol Med, 1995; 19:903-9.
206. Seven A, Candan G. Radikal ve lipid peroksid düzeyini arttıran etkenler. Biyokimya Dergisi, 1995; 4:43-56.
207. Sezgin G, Oztürk G, Güney S, Sinanoğlu O, Tunçdemir M. Protective effect of melatonin and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Ren Fail, 2013; 35(3):374-9.
208. Shaw L. A-phase Study Comparing Bioavialability of intra-venous and Subcutaneous Administration of Amifostine. Proc Am Soc Clin Oncol, 1997; 16:250.
209. Shaw PF, Kennaway DJ, Seamark RF. Evidence of high concentrations of melatonin in lateral ventricular cerebrospinal fluid of sheep. J Pineal Res, 1989; 6:201-8.
210. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. Microsurgery, 2004; 24:468-75.
211. Sivarajah A, Chatterjee PK, Patel NS, Todorovic Z, Hattori Y, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Thiemermann C. Agonists of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma reduce renal ischemia/reperfusion injury. Am J Nephrol, 2003; 23:267-76.
212. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. J Biochem, 1984; 222:1–15.
213. Snyder SH, Axelrod J. Circadianrhythm in the serotonin content in the pineal gland: Regulating factors. J Pharmacol Exp Ther, 1967; 158:206-13.
214. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin. Proc, 1988; 63:381-9.
215. Söyük S. Anjiografik Olarak Saptanan Arter Darlığının Derecesi ile Lipid-Lipoprotein, Lp(A), Apo A-I, Apo B ve MDA Düzeyleri Arasındaki İlişki (tez). Edirne: TÜ Tıp Fak, 2001.
216. Steenvoorden DP, Van henegouwen GM. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. J Photochem Photobiol B, 1997; 41(1-2):1-10.
217. Şehirli AO. Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001.
218. Şener G, Şener E, Şehirli Ö, Öğünç AV, Çetinel Ş, Gedik N and Sakarcan A. Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia-reperfüsion-induced injury in rats. Pharmacological Research, 2005; 52:216-22.
219. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest radikaller. Mersin Üniv Tıp Fak Der, 2000; 1 (1):52-8.
220. Tan DX, Manchester LC, Reiter J. High physiological levels of melatonin in bile of mammals. Life Sci, 1999; 65, 523-9.
221. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. Biomed Pharmacother, 2003; 57:399-411.
222. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury-a review. JSR, 2008; 150:304.
223. Taşkıran A. Koroner By-Pass Yapılan Olgularda Lipid Hidroperoksit, Antioksidan Kapasite ve Oksidan Strese Duyarlılık (tez). Edirne: TÜ Tıp Fak, 2002.
224. Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. Am J Pathol, 1995; 146:67-74.
225. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immune redundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. Med Hypotheses, 2007; 68:1363-70.
226. Thornton MA, Winn R, Alpers CE, Zager RA. An evaluation of the neutrophil as a mediator of in vivo renal ischemic-reperfusion injury. Am J Pathol, 1989;135:509–15.
227. Tuzcu M, Sahin N, Dogukan A, Aslan A, Gencoglu H, Ilhan N, Kucuk O, Sahin K. Protective role of zinc picolinate on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. J Ren Nutr, 2010; 20 (6):398-407.

228. Türkyılmaz Z. Karaciğer İskemi-Reperfüzyon Zedelenmesinde Pentoksifilin, Dimetilsülfoksit ve Eksojen Melatoninin Koruyucu Etkilerinin Karşılaştırılması (tez). Edirne: TÜ Tıp Fak, 2003.
229. Uchiyama M, Miharama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem, 1978; 86 (1):271-8.
230. Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gammaglutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. Free Radic Biol Med, 1999, 27: 838–47.
231. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg, 1996; 83: 162-70.
232. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. Br J Surg, 1991;78:651-5.
233. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theroretical perspective on membrane damage and repair. Neurology, 1993; 43: 1656-65.
234. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007; 27:2514-23.
235. Woolfson RG, Millar CG, Neild GH. Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: current status and future direction. Nephrol Dial Transplant, 1994; 9:1529-31.
236. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions, 2006; 160:1-40.
237. Vakkuri O. Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. Acta Physiol Scand, 1985; 124:409-12.
238. Van den Heuvel MGW, Buurman WA, Bast A. Review: ischemia-reperfusion injury in flap surgery. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2009; 62:721.
239. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, 2007; 39:44-84.
240. Vatanabe T, Kiron V, Satoh S. Trace minerals in fish nutrition. Aquaculture, 1997; 151:185-207.
241. Vedder NB, Fouty BW, Winn RK, Harlan JM, Rice CL. Role of neutrophils in generalized reperfusion injury associated with resuscitation from shock. Surgery, 1989; 106:509-16.
242. Veneroso C, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. J Pineal Res, 2009; 47:184–91.
243. Verma SP, Sonwalker N. Structural changes in plasma membranes prepared from irradiated Chinese hamster V79 cells as revealed by raman spectroscopy. Radiat Res, 1991; 126, 27-35.
244. Vermeulen M, Palermo M, Giordano N. Neonatal pinealectomy impairs murine antibody dependent cellular cytotoxicity. J Neuroimmunol, 1993; 43:97-102.
245. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. Cardiovasc Res, 2004; 61: 481-97.
246. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacol Rev, 2002; 54:375-429.
247. Vural N. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, 2005; 37.
248. Yan M, Ling YL, Huang SS, Gong SQ, Xu ZX. Changes in pulmonary Cu-Zn contents in superior mesenteric artery occlusion shock of rabbit. Biol Trace Elem Res, 1991; 29:281-8.
249. Yavuzer N. Karaciğerde iskemi reperfüzyon ile indüklenmiş rejenerasyon modelinde kompleman inhibitörünün rolü (Tez). Ankara: Başkent Üniversitesi Sağlık Blimleri Enstitüsü, 2008.
250. Yılmaz B. Epifiz (Pineal bez). Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. Birinci basım. Ankara: Feryal Matbaacılık, 1991; 81.
251. Yildirim Z, Kotuk M, Erdogan H, Iraz M, Yagmurca M, Kuku I, Fadillioglu E. Preventive effect of melatonin on bleomycin-induced lung fibrosis in rats. J Pineal Res, 2006; 40: 27-33.
252. Yu QJ, Wang YL, Zhou QS, Huang HB, Tian SF, Duan DM. Effect of repetitive ischemic preconditioning on spinal cord ischemia in a rabbit model. Life Sci, 2006; 79(15): 1479-83.
253. Yu BP, Chung HY. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. Mechanisms of Ageing and Development, 2006; 127:436-43.
254. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. Molecular Aspects of Medicine, 2009; 30:29-41.
255. Zhang JL, Rusinek H, Chandarana H, Lee VS. Functional MRI of the kidneys. J Magn Reson Imaging, 2013; 37(2): 282-93.

256. Zhang W, Smith C, Shapiro A, Monette R, Hutchison J, Stanimirovic D. Increased expression of bioactive chemokines in human cerebromicrovascular endothelial cells and astrocytes subjected to simulated ischemia in vitro. J Neuroimmunol, 1999; 101:148-60.
257. Zhao H, Gong J, Wang Y, Zhang Z, Qin P. Renal hemodynamic changes with aging: a preliminary study using CT perfusion in the healthy elderly. Clin Imaging, 2010; 34(4):247-50.
258. Zhou Z, Sun X, Lambert JS, Saari JT, Kang JY. Metallothionein-independent zinc protection from alcoholic liver injury. Am J Pathol, 2002; 160:2267-74.
259. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am, 1992; 72:65-83.

EK-B: İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi (Sener ve ark 2007).



10. ÖZGEÇMİŞ

Mine YILMAZ 1987'de Konya'da doğdu. İlköğretimi Özel İdare 100. Yıl İlköğretim okulunda, liseyi Mehmet Akif Ersoy Lisesi'nde okudu. 2004'de Selçuk Üniversitesi Hemşirelik Bölümünde başladığı lisans öğrenimini 2008 yılında tamamladı. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalında 2010 Yılında Yüksek lisansa başladı. 2009 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesinde hemşire olarak çalışmaya başladı ve halen aynı görevi sürdürmektedir.