T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# SIÇANLARDA BEYİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA 3',4'-DIHYDROXYFLAVONOL'UN LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİSİ

**Merve ÇALIŞKAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**Danışman**
**Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ**

**KONYA-2014**

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# SIÇANLARDA BEYİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA 3',4'-DIHYDROXYFLAVONOL'UN LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİSİ

**Merve ÇALIŞKAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**Danışman**
**Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14202015 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2014**

## ÖNSÖZ

İskemi-reperfüzyon yaralanması süperoksit ve nitrik oksit gibi toksik metabolitlerin salınımını uyarmak suretiyle oldukça reaktif olan moleküllerin oluşumuna yol açarak lipidler, proteinler ve DNA hasarına neden olur. Oksidatif stresin iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası nörodejenerasyona da neden olduğu bilinmektedir. Beyinde oluşan iskemi-reperfüzyon süresine bağlı olarak farklı derecede doku ve fonksiyon kaybına sebep olur.

Sentetik bir flavonoid olan ve daha önceki çalışmalarda özellikle koroner iskemi de kalp dokusunda 1 haftaya kadar koruyucu etkileri olduğu tespit edilen 3',4'-dihydroxyflavonol'un (DiOHF) sıçanlarda deneysel beyin iskemi-reperfüzyonunda oksidan ve antioksidan sistemleri nasıl etkilediğine ilişkin çalışmaların bulunmadığı mevcut literatürlerden bilinmektedir.

Mevcut çalışma DiOHF'nin sıçanlardaki beyin iskemisi ve uzun süreli (7 gün) reperfüzyonda kan ve beyin dokusundaki oksidan ve antioksidan sistemlere etkisini dolayısıyla lipid peroksidasyonundaki koruyuculuğunu belirlemek önemli olacaktır.

Yüksek lisansım boyunca yardımlarını, engin bilgi ve deneyimini esirgemeden her zaman bilgilendiren, desteğini hep hissettiğim Sayın Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ'a

Bilgisi ve tecrübesiyle her zaman yardımcı olan Saygıdeğer Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI'ya

Tezimin laboratuvar ve analiz kısmında tecrübeleriyle bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Esma MENEVŞE ve Mine YILMAZ, deney kısmındaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZ ve Arş. Gör. Enver Ahmet Demir'e sonsuz teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanması sırasında yardım eden arkadaşlarıma, hiçbir zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR iv

1.GİRİŞ 1

1.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarı 1

1.2. Beyinin Anatomisi ve Fizyolojik Fonksiyonları 3

1.3. Beyin İskemisi 4

1.3.1. Serebral İskemi Reperfüzyon Teknikleri 6

1.4. Global Beyin İskemisi Patofizyolojisi 6

1.5. Serbest Oksijen Radikalleri 7

1.6. Antioksidanlar 7

1.6.1. Endojen Atioksidanlar 8

Glutatyon 8

Glutatyon Peroksidaz 9

1.6.2. Eksojen Antioksidanlar 10

1.7. Oksidanlar 11

1.7.1. Malondialdehid (MDA) 12

1.7.2. Ksantin Oksidaz 13

1.7.3. Nitrik Oksit 14

1.7.4. Flavonoidler 16

2. GEREÇ ve YÖNTEM 19

2.1. Deney Hayvanları 19

2.2. Geçici Global İskemi Oluşturulması 20

2.3. Kan ve Doku Analizleri 20

2.3.1. Protein Tayini 20

2.3.2. Doku Malondialdehid Düzeylerinin Belirlenmesi 21

2.3.3. Plazma Malondialdehid Seviyelerinin Belirlenmesi 21

2.3.4. Doku Glutatyon Analizi 22

2.3.5. Eritrosit Glutatyon Analizi 22

2.3.6. Doku ve Eritrosit Glutatyon Peroksidaz Tayini 23

2.3.7. Doku ve Plazma Nitrik Oksit Düzeyleri Ölçümü 24

2.3.8. Doku ve Plazma Ksantin Oksidaz Analizi 25

2.4. İstatistik 27

3.BULGULAR 28

4.TARTIŞMA 32

5.SONUÇ ve ÖNERİLER 38

6. ÖZET 39

7. SUMMARY 40

8. KAYNAKLAR 41

9. EKLER 48

EK. A: Etik Kurul Kararı 48

10. ÖZGEÇMİŞ 49

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AKİ : A. Karotis İnterna

AKK: A. Karotis kommunis

AMP: Adenozin Monofosfat

ATP: Adenozin 3'Trifosfat

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

CAT: Katalaz

cGMP: Siklik Guanosin Monofosfat

DiOHF: Dihidroksiflavonol

eNOS: Endoteliyal NOS

GPx: Glutatyon peroksidaz

GSH: Glutatyon

GSSG: Okside Glutatyon

GST: Glutatyon S-Transferaz

$H_2O_2$: Hidrojen Peroksit

$H_3PO_4$ : Fosforik asit

$HClO_4$ : Perklorik asit

HOONO: Hidroksinitrit

iNOS: Uyarılabilir NOS

KCl: Potasyum Klorür

KDH: Ksantin Dehidrojenaz

$L^{\cdot}$: Lipid Serbest Radikalleri

$LOO^{\cdot}$ : Lipid Peroksit Radikalleri

LOOH: Lipid Peroksit

MDA: Malondialdehid

$NAD^+$: Nikotinamid adenin dinükleotid

NaOH: Sodyum Hidroksit

nNOS: Nöronal NOS

NO: Nitrik Oksit

$NO_2$: Nitrojen dioksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

$O_2^-$ : Süperoksit Radikalleri

$O_2$: Oksijen

$OH^{\cdot}$: Hidroksil Radikalleri

ONOO: Peroksinitrit

PAF: Trombosit aktive edici faktör

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SOD: Süperoksit dismutaz

XO: Ksantin Oksidaz

# 1. GİRİŞ

Bir dokuya giden kan akımı azaltıldığında veya kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayıp hücre ölümüne kadar giden süreçte birçok kimyasal olaylar cereyan eder. Dokulara giden kan akımının damarlarda oluşan pıhtı veya mekanik etkenlerle engellenmesinden dolayı dokuların ihtiyacının karşılanamaması "iskemi" olarak tanımlanır (Herbert ve ark 2001).

İskemi hücresel hemostaz için gerekli olan enerji kaynaklarından özellikle ATP'nin tüketimi neticesinde, hücre membranında iyon dengesizliğine neden olur. Özellikle $Na^{+}$ ve $Ca^{+2}$ iyon dengesindeki bozulma sonucu asidoz veya ozmotik şok görülebilir (Grace 1994, Lin ve ark 1999, Girotti 2000, Semenza 2000).

Farklı nedenlere bağlı olarak dokulara kan akımının tekrar başlamasına ise "reperfüzyon" denir. Böylece reperfüzyonla, iskemide görülen dokudaki toksik maddelerin uzaklaştırılması ve enerji ihtiyacının karşılanmasını sağlanır. Ancak reperfüzyonla birlikte dokuda oluşan hasarın daha da artması söz konusudur (Slegtenhorst ve ark 2014). Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği bir mekanizmayla gerçekleşir.

## 1.1. İskemi / Reperfüzyon Hasarı

İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğunda önemli hasar olmayabilir. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce iskemi yerinde ksantin oksidaz (XO) etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit ($H_2O_2$) ve süperoksit radikali ($O_2^{-}$) oluşur. Bunların etkisiyle de iskemi/reperfüzyon hasarı ortaya çıkar (Van den Heuvel ve ark 2009).

İskemi ve reperfüzyon sırasında görülen enerji yetersizliği, iyon dengelerinin bozulması, hücre içi asidoz, fosfolipid metabolizmasında değişiklik, serbest yağ asitleri ve serbest oksijen radikallerinin yapımında artış gibi bazı kimyasal değişiklikler ortaya çıkar (Yamamoto ve ark 1983, Aebi ve ark 1988). Bu kimyasal değişiklikler önlenemez veya düzeltilemez ise hücrelerin ölümü gerçekleşir.

Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir (Bathe ve ark 1998, Semenza 2000, Terzi ve ark 2000). Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir. Ayrıca reperfüzyon hasarına doğrudan ya da dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda iskemi-reperfüzyon hasarının reperfüzyon kısmının ajanları olan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar (Jiang ve ark 2008). Bunlar:

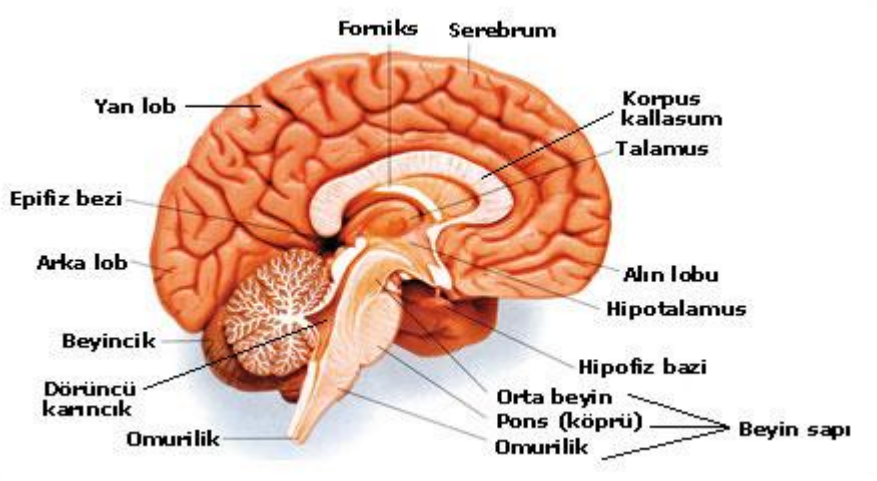
- Ksantin oksidaz
- Nötrofillerin aktivasyonu
- Endotelial faktörler: Araşidonik asit metabolitleri
  Nitrik oksit
  Endotelin
- Trombosit aktive edici faktör (PAF)
- Komplemanlar
- Sitokinler
- Prostaglandinler
- Katekolamin oksidasyonu

Serbest radikaller, en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren, kısa ömürlü ve stabil olmayan moleküllerdir. Bu moleküller oksijenin indirgenmesi ve eksitasyonu ile diğer serbest oksijen radikallerini üretebilirler (Grace 1994, Ertan ve ark 2001).

Hücreler serbest oksijen radikallerinin hasarına bağışıklık kazanmamışlardır. Ancak genellikle glutatyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmaktadır (Koc ve ark 2014). İskemik dokularda, serbest oksijen radikalleri üreten intraselüler mekanizmalar aktif durumdadır. Ancak oksijen sağlanamamasından dolayı görevlerini yapamazlar. Kan akımı ve yeniden oksijen sağlanması ile büyük miktarda serbest oksijen radikalleri üretilerek reperfüzyon hasarı görülür (Lin ve ark 1999).

Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyonları başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse birçok reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirleri başlatılır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olur (Ertan ve ark 2001).

## 1.2. Beyinin Anatomisi ve Fizyolojik Fonksiyonları




Resim 1.1. Beyinin bölümleri (http://www.vucutelektrigi.com)

Beyin dört bölgede incelenir. Bunlar serebrum (cerebrum), diencephalon, beyin sapı ve serebellumdur. Serebrum, santral sinir sisteminin en büyük ve kompleks kısmıdır. Longitudinal fissur ile sağ hemisfer ve sol hemisfer olmak üzere ikiye ayrılır. Her bir hemisfer bir korteks (gri madde), beyaz madde ve bazal gangliondan meydana gelir. Korteks kısmında nöron hücreleri, beyaz maddede ise aksonlar vardır.

Serebral korteks, serebrumun tüm kıvrımlarını bir örtü gibi saran gri maddeden oluşan bir yapıdır. Serebral korteks yüzey alanını artırmak için kıvrımlar yapmıştır. Bu kıvrımların çıkıntı veya şişkinliklerine girus, oluk gibi girintilere ise sulkus denir.



Resim 1.2. Serebral korteksin yapısı (http://www.delinetciler.org )

Kas aktivitesinin kontrolünde kas kasılmasını uyaran serebral korteks alanlarının yanı sıra beynin başka iki yapısı da normal motor işlev için gereklidir. Bu yapılar serebellum ve bazal gangliyonlardır. Bu yapılar tek başlarına kas aktivitesini sağlamazlar ancak motor kontrolle ilgili diğer sistemlerle ilişki kurarak bu görevi yerine getirirler (Pathak ve ark 2014).

Serebellum bir hareketten diğerine hızlı ve düzgün geçişte, motor aktivitelerin zamanlamasında önemli rol oynar. Ayrıca agonist ve antagonist kaslar arasında gerekli etkileşimin düzenlenmesinde ve kas yükü değiştiğinde kas kasılma şiddetlerinin kontrolüne yardımcı olur (Gaur ve ark 2009).

Bazal gangliyonlar, özel karmaşık motor amaçlara ulaşmak için paralel ve çoklu ardışık hareketlerin ardı ardına gelmesini, hareketlerin doğrultusunu ve ardışık hareketlerin oransal şiddetinin düzenlenmesini kontrol ederek, karmaşık kas hareketlerinin planlanmasına ve kontrolüne yardım eder (Ma ve ark 2008).

## 1.3. Beyin İskemisi

Beyin iskemi, seçilmiş bir beyin bölgesinde veya tüm beyinde yayılabilen serebral kan akımında oluşan azalmadır (Harukuni ve ark 2006). Serebral iskemi beyin dokusunun oksijeninin ve beslenmesinin azalmasına ve kalıcı olursa hücre fonksiyonunda geriye dönüşü olmayan hasara neden olmaktadır (Ujita ve ark 2011).

Oksidatif stres beyin iskemisinin deneysel modellerinde meydana gelen beyin yaralanmasında önemli bir rol oynar (Al-Majed ve ark 2006).

Serebral iskemi modelleri; Fokal serebral iskem, Global serebral iskemi, Ön beyin iskemisi şeklinde oluşturulabilir.

Global veya fokal serebral iskemi bir veya birkaç arterin mekanik olarak ligasyonu veya emboli oluşturmak amacıyla arter lümeninin içine yabancı bir maddenin sokulması ile oluşmaktadır. Geçici global modellerinde şiddetli sistemik hipotansiyon sonucunda hemodinamik arrest veya kardiyak arrestin patofizyolojisindeki gibi seçici nöronal hasar görülmektedir (Small ve ark 2000, Undén ve ark 2013). Kısa süreli global iskemi yaygın beyin alanlarını etkiler ancak hassas beyin bölgelerinde de seçici nöronal değişikliklere yol açmaktadır (Wolfgang 1999, Small ve ark 2000, Undén ve ark 2013).

Ön beyin iskemisi modeli, tam olarak global değildir fakat ön beyinle sınırlıdır. Bu model, nadiren görülen bilateral ön beyin iskemisinin klinik durumunu tam olarak yansıtmamaktadır (Gupta ve Briyal 2004).

İki taraflı A. Karotis kommunis (AKK) tıkanması; Bu model sıçan ve farelerde uygulanmamaktadır. Vertebral arter ve A. Karotis İnterna (AKİ) anastomozu gerbillerde olmadığı için kullanılabilmektedir. Her iki AKK'nin 10-15 dk tıkanması ile hipokampusun CA1, striatum ve neokorteksin 3-4-5-6. tabakalarında seçici nöronal hasar gelişmektedir (Kuraiwa ve ark 1990).

Dört damar oklüzyon modeli; Her iki vertebral arter elektrokoagülasyonla tıkanır sonra her iki AKK klips ile kapatılır. İskemiden sonra klipsler kaldırılarak reperfüzyon oluşumunun da sağlanabilmesi bu modeli üstün kılmaktadır (Pulsinelli ve Buchan 1988).

İki taraflı AKK oklüzyonu ile birlikte hipotansiyon oluşturulması; AKK'lerin klemplenmesinden sonra hayvandan kan alınarak tansiyonun 30-35 mmHg'ye düşürülmesiyle oluşturulan bir modeldir, bunda da AKK'lerdeki klipsler kaldırılarak reperfüzyon oluşturulabilmektedir.

Yüksek tansiyonlu sıçanlarda iki taraflı AKK tıkanması; Normal sıçanlarda iskemi oluşturmayan bu yöntem, hipertansif hale getirilmiş sıçanlarda iskemi oluşumunu sağlayabilmektedir (Horst 1997).

### 1.3.1. Serebral İskemi Reperfüzyon Teknikleri

Serebral iskemi-reperfüzyon için sıklıkla kullanılan deneysel modeller; iki taraflı karotid arter oklüzyonu ve middle serebral arter oklüzyonudur (Singh ve Chopra 2013). İki taraflı karotid arter oklüzyonunda, serebral hipoperfüzyona bağlı değişiklikler incelenebilmektedir. Orta serebral arter oklüzyonunda ise değişik inme (stroke) modelleri çalışılabilir (Sarti ve ark 2002).

## 1.4. Global Beyin İskemisi Patofizyolojisi

İskemik hasara beyindeki gri madde beyaz maddeden, serebral korteks beyin sapından daha duyarlıdır. İskemi sonrası beyinde gelişen değişiklikler:

- Hücre içi $Ca^{+2}$ birikmesi
- Hücre dışında aspartat ve glutamatın artması
- Serbest radikallerin artması şeklindedir (Saleem ve ark 2006).

İskeminin başlangıcından itibaren hasar başlar (Ghosh ve ark 2013). İskemi alanında 6-8 dakikada kalıcı nöron hasarı oluşmaya başlar ancak çevre alanlarda halen yaşama dönebilecek nöronlar bulunmaktadır. Nöronal hasar sadece iskemi ile açıklanamaz, eşlik eden metabolik ve hemodinamik süreçlerde hasardan sorumlu olmaktadır. Serebral iskemi başladığında oksijenin yokluğu ile birlikte 10 sn içinde bilinç kaybı ortaya çıkar; 2-4 dakika içinde de glukoz yokluğu bu süreci izler. ATP konsantrasyonu başlangıçta alternatif yolları kullanarak belirli bir düzeyde kalır (Li ve ark 2011). 5-6 dakika sonra ATP azalmaya başlar. Enerjinin %50-75'ni kullanan iyon kanalları enerji azalmasına bağlı olarak bozulur ve potasyum hücre dışına, $Na^{+}$ ve $Ca^{+2}$ hücre içine girer. Resüstasyon sonrası reperfüzyon ve reoksijenizasyon sağlandıktan sonra hücre hasarı devam eder (Yuan ve ark 2012). Mortalite ve morbiditeyi kötü etkiler.

## 1.5. Serbest Oksijen Radikalleri

Yaşam için gerekli olan oksijen, metabolik olayların akışı içerisinde bazı ara ürünlere çevrilir. Oksijen serbest radikalleri ya da kısaca serbest radikaller olarak da adlandırılan bu reaktif ürünler, oksijenin toksik etkilerinden sorumlu olup kanser dahil çoğu hastalığın nedenini oluşturmaktadır (Allen ve Bayraktutan 2009).

Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır (Nawar 1996). Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla "çift oluşturmamış" elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron, serbest radikallere büyük bir reaktiflik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır (Allen ve Bayraktutan 2009). Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (Diplock 1998).

Normal metabolizma olayları sırasında çeşitli basamaklarda serbest oksijen radikalleri oluşabilir. Oluşan bu serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme ihtimali bulunsa da, bazı metabolik olayların devamı için kesinlikle olması gerekir. Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (Diplock 1998).

## 1.6. Antioksidanlar

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere "antioksidan" adı verilir (Elliot 1999). Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, "süpürücü" etkidir. Antioksidan enzimler, küçük moleküller bu tip etki gösterirler (Reiter 1995, Karihtala ve Soini 2007).

2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle "dönüştürme" etkisidir. Vitaminler, flavonoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler (Cherubini ve ark 2008).

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki "zincir kırıcı" etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler (Mickle ve ark 1993).

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması "onarıcı" etkidir (Virag ve ark 2002).

Antioksidanlar endojen ve eksojen olmak üzere 2'ye ayrılırlar.

1.6.1. Endojen Antioksidanlar

a.Enzim olan endojen antioksidanlar; Süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GPx), Glutatyon S-Transferaz (GST), Katalaz (CAT), Hidroperoksidaz, Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi (Valko ve ark 2007).

b.Enzim olmayan endojen antioksidanlar; Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Hemoglobin, Bilirubin, Miyoglobin, Ferritin, Glutatyon (GSH), Sistein, Metiyonin, Ürat, Laktoferrin, Albümin (Sener ve ark 2002).

Glutatyon (GSH)

Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan ve hücrelerin protein yapısı dışındaki sülfidril grubu içeriğinin % 90 kadarını oluşturan glutatyon (GSH), zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli rollere sahiptir. GSH radikal kaynaklı hasara karşı koyarken antioksidan enzimlere substrat olarak görev yapar ve bir radikal tutucusu gibi davranır. GSH, hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre

içindeki en önemli antioksidan bileşiktir. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde γ-glutamil sistein sentaz ve GSH sentaz enzimleri katalizördür. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün engellenmesinde rol alır (Reiter ve ark 1995).

GSH serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. 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 (Mogulkoc ve ark 2006).

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan hücresel antioksidanlardır. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutatyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutatyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir (Di Mascio ve ark 1991). Aktivitesi için Se mineraline ihtiyaç duyan GPx enzimi, glutatyon'un indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş hale (GSSG) dönüştürmektedir.

$$2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2\ H_2O$$

Glutatyon aynı zamanda hücre içinde tekli oksijen ($^1O_2$), süperoksit anyonu ($O^{2-}$), hidroksi (·OH) radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir (Larson 1988).

Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz (GPx) sitozolde bulunur, 4 selenyum atomu içerir, tetramerik yapıdadır. Glutatyon peroksidaz glutatyonun indirgenmiş halini elektron vericisi olarak kullanarak, peroksitlerin detoksifikasyonunda merkezi bir rol oynar. Lipid peroksidasyonun başlamasını ve gelişmesini engeller (Fujii J ve ark 2003, Fujii J ve ark 2005). Bu enzimler aminoasitlerinin aktif merkezlerinde selenosistein içerip

içermemesine göre ikiye ayrılırlar. Peroksit detoksifikasyonunda önemli etkinliğe sahip enzim; selenyum içeren tipidir. Selenyumdan bağımsız olan tipinin ise antioksidan etkinliği düşüktür ve yalnızca lipid peroksitlerini metabolize eder (Burtis ve ark 2006).

GPx eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (Masella ve ark 2005). Eritrosit GPx aktivitesi yaşlılarda ve Down sendromlu hastalarda yüksek, prematürelerde düşük bulunmuştur. Lökosit GPx aktivitesi yaşlılarda ve hipertansiyonlu hastalarda yüksek bulunmuştur (Reiter ve ark 1995).

### 1.6.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olarak ayrılırlar.

a.Vitamin eksojen antioksidanları; α-tokoferol (E vitamini), β-karoten, Askorbik asit (C vitamini), 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 (GPx 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

## 1.7. Oksidanlar

Hücrenin metabolik yollarındaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif yerinde ara ürün olarak serbest radikaller oluşmaktadır. Oluşan bu serbest radikaller enzimlerin aktif yerinden sızan ve moleküler oksijenle etkileşerek serbest oksijen radikallerini oluşturur (Das ve ark 2008).

Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), "antioksidan" veya "antioksidan savunma sistemleri" denilen mekanizmalarla ortadan kaldırılırlar. Ancak bazen hücresel savunma mekanizması ortadan kaldırılandan daha fazla reaktif oksijen türü (ROS) oluşturabilir. Organizmada hücresel savunma mekanizması aracılığıyla ortadan kaldırılandan daha fazla reaktif oksijen türlerinin (ROS) meydana gelmesine oksidatif stres denir (Pradeep ve ark 2012).

Çizelge 1.1. Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma sistemleri (Diplock 1998)

| **Oksidan** | **Antioksidan Savunma** |
|---|---|
| Sigara dumanı | Süperoksit dismutaz |
| Egzersiz | Katalaz |
| Ateşli hastalıklar | Glutatyon peroksidaz |
| Radyasyon | Glutatyon |
| Çevre kirleticiler | Ubikinon |
| İskemi Karsinojenler | Selenyum |
| Çoklu doymamış yağ asitleri ile zengin bir diyet | Ürik asit |
| | E vitamini |
| | C vitamini |
| | β-karoten ve diğer karotenoidler |

Kurşun ve kadmiyum gibi bazı çevre kirleticilerine uzun süre maruz kalmalarından dolayı oksidatif strese neden olabilir ki bu biyolojik sistemde istenmeyen etkilere neden olur. Oksidatif stres, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengenin bozulmasıdır (Abdollahi ve ark 2003, Abdollahi ve ark 2004).

### 1.7.1. Malondialdehid (MDA)

Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehid (MDA)'dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranından iyon alışverişine etki ederek membrandaki iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliğinden dolayı DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (Niki 1987, Placer ve ark 1990, Kalender ve ark 2002).

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan moleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Shi ve ark 2013).

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir.

Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar.

Lipid radikali (L) dayanıksız bir bileşik olup değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin (L) moleküler oksijenle ($O_2$) etkileşimi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO·) oluşur. Lipid peroksit radikalleri (LOO·), membran yapısındaki diğer yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine (LOOH) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.

$$L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$$
$$LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot$$

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkımı geçiş metalleri katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynakları aracılığıyla uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten ($H_2O_2$) fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikalleri (OH) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir.

Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehit oluşur. Bu bileşikler ya hücre yüzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerinde hasar oluştururlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir.

### 1.7.2. Ksantin Oksidaz (XO)

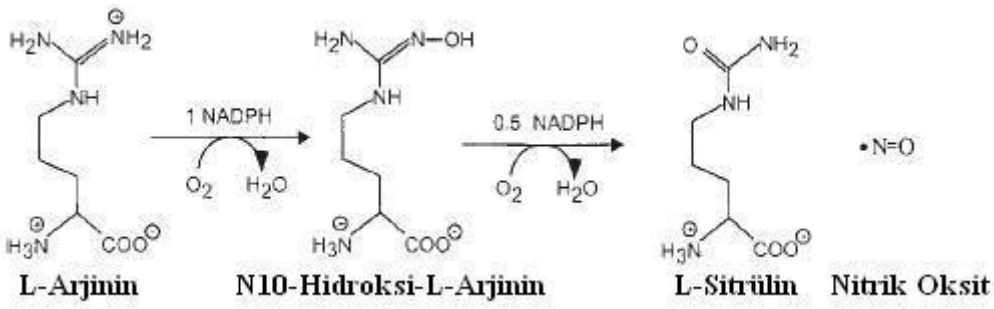
İskemik dokuda reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturan enzimatik kaynaklardan biridir. İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Dokuya gelen kan akımının kesilmesi ile hücresel oksidatif fosforilasyon azalır ve adenozin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır (Jennings ve ark 1991). Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan $Na^+$-$K^+$-ATP az pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde $Na^+$ ve $Ca^{+2}$ iyon konsantrasyonları artar (Green ve ark 1989). Hücre içinde $Ca^{+2}$ iyon konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir (Orrenius ve ark 1992). Böylece bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflamatuar sitokinlerin lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma olur. Bu durum hücrenin reperfüzyon hasarına karşı dayanıksız olmasına neden olur.

İskemi döneminde ATP üretimi durur. Ancak kullanılmaya devam edildiği için ATP'den AMP ve adenozin oluşur. Adenozin, hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat

bileşiklerinin (ATP) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (XO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı $NAD^+$ (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) dir. Ancak iskemi nedeniyle KDH → XO'a dönüştüğünden hipoksantinin ürik asite dönüşümü XO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır (Parks ve ark 1988). Ksantin oksidazın beyinde ödem, iskemi, damar geçirgenliğinde değişkenlik gibi oksidatif hasarlara neden olduğu bilinmektedir (Lavelli 2000).

### 1.7.3. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit (NO) gaz halinde vazodilatatör etki gösteren bir serbest radikaldir. L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla NO ve sitrulini meydana getirmektedir.




Şekil1.1. Nitrik Oksit Sentaz Tepkimesi (Stuehr 2004)

Nitrik oksit (NO) sentezinin insanda vasküler tonusun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı, kan basıncı ve böbrek fonksiyonunun kontrolünde bir role sahip olduğu bilinmektedir. Nitrik oksit (NO) vasküler endoteliyal hücrelerde oluşturulan önemli bir vazodilatatördür. NO düz kas hücrelerine girer ve 3',5'-siklik GMP (cGMP) oluşturmak üzere solubl guanilat siklazı stimüle eder. Böylece hücrede cGMP konsantrasyonu artar. Düz kas hücrelerinde cGMP, bir veya daha fazla protein kinazı cAMP gibi aktive eder. Aktive olan protein kinazlar düz kasın ve ardından damarların gevşemesinden sorumludurlar.

NO bir adet eşlenmemiş elektronu olan küçük bir moleküldür. NO nörotransmisyon, kan basıncı regülasyonu, savunma mekanizmaları, düz kas gevşemesi ve immun regülasyon gibi süreçlerde oksidatif biyolojik sinyal molekülü olarak görev yapan bir radikaldir. Sitoplazmadan ve plazma membranından kolayca diffüze olur. Ekstrasellüler alanda oksijen ve nitrojenle reaksiyona girerek "Nitrit" ve "Nitrat" anyonlarını oluşturur (Gutteridge 1995, Pastor ve ark 1998).

NO sentezini nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi sağlamakta ve bu enzimin 3 çeşidi bulunmaktadır: endoteliyal NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS).

Nöronal NOS (tip I, nNOS) ve endoteliyal NOS (tip III, eNOS), $Ca^{+2}$ ve kalmodulin bağımlı esas izoformlardır. Nöronal NOS (tip I, nNOS), nöral iletide fonksiyon görür.

Endoteliyal NOS (tip III, eNOS) böbreklerde bulunur. Endoteliyal NOS (tip III, eNOS) vasıtasıyla oluşturulan nitrik oksit (NO), vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesi için en önemli sinyaldir.

İndüklenebilir NOS (tip II, iNOS) normal şartlar altında bulunmaz. İnflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından uyarılabilir ve uzun dönemde bol miktarda üretilir.

Nitrik oksidin serbest oksijen radikalleriyle etkileşimi ve antioksidan özellikleri ile ilgili araştırmalardan farklı bulgular elde edilmiştir. Aktif makrofajların mikrosidal aktivitelerini NO aracılığıyla gösterdikleri ileri sürülmekle birlikte, doğru mediatörün NO'dan üretilen nitrojen dioksit ($NO_2$) gibi ikincil bir oksidan madde olabileceği düşünülmektedir (Kalff ve ark 1999). Ortamda oksijen varsa NO'dan $NO_2$ ve iki elektronlu oksidanlar olan $N_2O_3$ ile $N_2O_4$ oluşur. Süperoksidi bağladığı için NO'nun serbest radikalleri temizleyen koruyucu bir faktör olduğu düşünülmektedir. Süperoksit ile NO reaksiyonunun ürünü olan peroksinitrit (ONOO) ise güçlü ve yarılanma ömrü uzun bir oksidandır. Organizmada peroksinitrit, hidroksil radikali gibi davranan hidroksinitrite (HOONO) dönüşür. Peroksinitritin parçalanmasıyla yüksek konsantrasyonlarda $NO_2$ oluşur (Kalff ve ark 1999). Bu

reaktif nitrojen bileşikleri lipidler, DNA, tiyoller, amino asitler ve metallerle reaksiyona girerek enzim fonksiyonlarını bozar, membran bütünlüğüne zarar verir. Diğer taraftan DNA mutasyonuna neden olabilmektedir (Eiserich ve ark. 1998). Lipid peroksidasyonu ile kaçınılmaz süreçtir (Kuo ve Schroeder 1995).

Beyin iskemi-reperfüzyon çalışmalarında NO'nun düzeyi incelenmiş ve bu molekülün artış gösterdiği belirlenmiştir (Cai ve ark 2007, Aruna Devi ve ark 2010). Gaur ve Kumarı'ın (2010) gerçekleştirdiği çalışmada da hesperidinin NO ile ilgili serebral iskemi-reperfüzyon yaralanmasını azalttığı gösterilmiştir. Benzer bir çalışma da ise bir flavonoid türü olan flavonun serebral-iskemi reperfüzyon yaralanmasına karşı koruyucu bir etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Guo ve Chen 2008).

### 1.7.4. Flavonoidler

Flavonoidler bazı bitkilerde bulunan düşük molekül ağırlığına sahip polifenolik bileşiklerdir. 15C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı ($C_6$-$C_3$-$C_6$) gösterdikleri için polifenolik bileşikler olarak adlandırılırlar. Bitkilerdeki yeşil, turuncu, kırmızı pigmentlerden sorumlu yapılardır. Flavonoidler iskelet yapılarının farklı olmasına göre flavon, flavonol, flavonon, biflavonoid, kalkon gibi türleri vardır (Pütün ve ark 1987, Bors ve ark 1990, Formica ve ark 1995).

Flavonoidler bitkisel gıdalarda bol olarak bulunan bileşiklerdendir. Yüksek flavonoid içerikli sebze, meyve ve kırmızı şarap tüketen beslenme tarzına sahip olanlarda koroner kalp hastalıklarında ölüm riskini azaltabileceği ile ilgili çalışmalar olmuştur (Potenza ve ark 2007). Ayrıca flavonoidlerin miyokard da iskemi-reperfüzyonun sebep olduğu oksidatif hasarı azalttığı görülmüştür (Ikizler ve ark 2007).

Flavonoidler antioksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidlerin etki mekanizmaları şu şekilde sıralanabilir:

a.Flavonoidler öncelikle ROS oluşumunu engelleyerek antioksidan etkilerini gösterebilirler.
b.ROS' u direkt olarak uzaklaştırabilirler.
c.İndirekt olarak hücrelerin antioksidan enzimlerini artırma ve lipofilik antioksidanları koruma yoluyla yaparlar.

Flavonoidlerin antioksidan özelliklerinden başka antitümör, antiviral, antitrombotik, antihipertansif, antialerjik, antiinflamatuar, antiapoptik ve antikanserojen etkileri rapor edilmiştir (Nandave ve ark 2005).

Antitümör etkisini: Hücreler arası iletişimi artırarak, ornitin dekarboksilazı ve timidin DNA' nın yapısına katılmasını inhibe etmek suretiyle hücre proliferasyonun inhibe eder, İlgili reseptörleri bloke ederek antiproliferatif etki göstererek, laktat transpotunu inhibe ederek vasküler dokunun endotelyumundaki nitrik oksit (NO) sentezinin regülasyonunu düzenleyerek antitümör etki gösterir (Formica ve ark 1995).

Antiviral etki: Flavonoidlerin antiviral etkisi viral proteinlere bağlanma yeteneği ile ilgilidir. Örnek olarak metil quercetin' in polivirüsünün replikasyonunu ve hücresel protein sentezini bloke ederek önlemektedir (Stavric 1994, Formica ve ark 1995)

Antitrombotik etki: Platelet cAMP konsantrasyonunu artırarak, siklikfosfodiesteraz aktivitesini inhibe ederek, platelet agregasyonunu önleyerek, eikozonoid metabolizmasındaki reaksiyonları inhibe ederek etkilerini gösterirler (Formica ve ark 1995, Gryglewski ve ark 1987).

Antialerjik etki: Mast hücresinin ve histamin salınımının inhibe ederek etkilerini gösterirler (Stavric 1994, Formica ve ark 1995).

Antiinflamatuar etki: Histamin salımını, lökotrien sentezini inhibe ederek etkilerini gösterirler (Stavric 1994, Formica ve ark 1995).

Flavonoller güçlü antioksidan aktiviteye sahip olan polifenolik moleküllerdir. Dihidroksiflavonol (DiOHF) yapısal olarak quersetine benzeyen, güçlü bir antioksidan olduğu, ayrıca iskemi-reperfüzyon yaralanması ve diabette endoteliyal fonksiyonu geliştirdiği gösterilmiştir (Mosawy ve ark 2013). Başka bir çalışmada ise kalpte iskemi-reperfüzyon hasarında DiOHF'nin etkisi incelenmiş ve özellikle reperfüzyondan 7 gün sonra bile faydalı etki oluşturduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark 2009).

Mevcut çalışmanın amacı da sıçanlarda geçici global serebral-iskemi reperfüzyonu öncesi ve sonrasında periton içi 3',4'-dihydroxyflavonol (DiOHF) uygulamasının plazma ve beyin dokusundaki oksidan ve antioksidan sistemler üzerindeki etkilerini belirlemektir.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Deney Hayvanları

Mevcut çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinin 2013/202 nolu etik kurul onayı ile aynı merkezden temin edilen ortalama olarak 350-400 gr ağırlığında olan 34 adet erkek Wistar-albino türü sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Bütün sıçanlara ısı ve ışık miktarları kontrol edilen odalarda su ve yemleri ad libitum olarak verildi. Çalışmada deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu.

1-Sham-grubu (n=6):Sıçanlar periton içi (i.p) olarak uygulanan ketamin hidroklorür (60 mg/kg) ve Xylasine (rompun) (10 mg/kg) ile anestezi edildikten sonra karotid arter bölgesi cerrahi olarak açıldı ve arter oklüzyonu yapılmaksızın, dihydroxyflavonol (DiOHF) çözücüsü (fındık yağı ve %5'lik DMSO) periton içi olarak uygulandı.

2-İskemi + Reperfüzyon grubu (n=7): Anestezi yapılan hayvanlarda karotid arterler klemplenmek suretiyle 20 dakika iskemi oluşturulacak takiben reperfüzyon (7 gün) yapılarak, DiOHF çözücüsü yine periton içi yoldan verildi.

3-DiOHF + İskemi + Reperfüzyon grubu (n=7) : İskemiden bir saat önce DiOHF çözdürülüp (fındık yağı + %5'lik DMSO) 10 mg/kg olarak periton içi hayvanlara uygulandı. Daha sonra ise yukarıda belirtildiği şekilde 20 dakika iskemi ve takiben reperfüzyon (7 gün) yapıldı.

4-İskemi + DiOHF (10 mg/kg) + Reperfüzyon grubu (n=7) : Bu grupta hayvanlar öncelikle 20 dakika süreyle iskemi yapıldı. İskeminin sonlandırılmasını takiben DiOHF 10 mg/kg olarak periton içi verildikten sonra reperfüzyon (7 gün) gerçekleştirildi.

5-İskemi + Reperfüzyon + DiOHF + (10 mg/kg) grubu (n=7) : Havyanlara ilk olarak 20 dakika süreli iskemi ve aynı süredeki reperfüzyonu takiben bahsedilen dozda

DiOHF takviyesi yapıldı ve 7 günün sonunda hayvanlar öldürüldü. DiOHF Indofine Company'den (Hillsborough, NJ, USA) satın alındı.

## 2.2.Geçici Global İskemi Oluşturulması

Hayvanların 12 saatlik açlık periyodunu takiben operasyon öncesi serbestçe su almaları sağlandı. Geçici global iskemi serebral iskemi modeli daha önceden Singh ve Chopra'nın tanımladığı şekilden küçük modifikasyonlar yapılmak suretiyle genel karotid arterlerin bilateral olarak oklüzyonuyla sağlandı. Kısaca sıçanlar ketamin HCl (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) periton içi (p.i) uygulamasıyla anestezi edildikten sonra yüz üstü pozisyonda operasyon masasına yerleştirildi. Boyunda orta hattan ventral insizyon yapılarak sağ ve sol karotid arterler etrafındaki dokulardan dikkatlice ayrıldı ve takiben a travmatik mikro cerrahi klipsler ile kapatıldı. 20 dakika sonra klempler kaldırılarak insizyonun kapatılmasından önce yeniden kan akımının başladığı teyit edildi. Operasyon sırasındaki sıvı kaybını önlemek için 37$^{o}$C ısıdaki serum fizyolojik (5 ml) hayvanlara deri altı yoldan verildi. Sham-grubunda ise benzer şekilde boyun bölgesi açıldı ancak karotid arterlerde oklüzyon yapılmadı.

Deney sürelerinin sonunda hayvanlar anestezi edilerek kalpten kan alındıktan sonra servikal dislokasyon ile öldürülerek beyin dokuları alındı. Hayvanlardan alınan kan ve beyin korteks dokusu örneklerinde GSH, GPx, MDA, NO ve Ksantiz oksidaz düzeyleri belirlendi.

## 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 homojenat oluşacak şekilde parçalandı. Elde edilen homojenatlar 3000 devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. 50µl süpernatant 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 karışım distile suyla 1 lt'ye tamamlandı.

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

Sodyum sülfat için 20gr sodyum sülfat alınarak 100 ml distile suyla seyreltildi. Değerler gr/dl olarak ifade edildi. Hesabı: A numune x 22,67 (g/dl)

### 2.3.2. Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi

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 $HClO_4$ 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 nmol/g doku olarak tanımlandı.

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/ml şeklindedir.

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

Hesabı: $A = a \times b \times c$

$c = A / a \times b$

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

$c = ( A / 1.56 \times 10^{5}\ M^{-1} ) \times 9{,}09$

$c = A \times 58{,}27$ nmol/ml şeklindedir.

Sonuçlar nmol/ml olarak verildi.

### 2.3.4. Doku Glutatyon Analizi

GSH düzeylerini belirlemek için MDA'da tanımlandığı gibi doku $4^{o}C$'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 tamponu (pH=6,8), 78 ml 1 N NaOH ve 100 µl Ellman's solüsyonu ilave edilerek 5 dakika bekletildikten sonra spektrofotometre cihazında 412 nm'de distile suya karşı absorbansları okundu.

Hesabı: $C_{numune} = (A_{örnek}/A_{standard}) \times C_{standard}$ olarak hesaplandı.

Burada $C_{standard}$=15.36 mg/dl olarak bulundu.

Doku proteini Biüret metoduyla elde edilerek değerler µmol/gr protein olarak hesaplandı (Ellmann 1959).

### 2.3.5. Eritrosit Glutatyon Analizi

Eritrosit GSH ölçmek amacıyla EDTA'lı tüplere alınan kan numuneleri 3000 rpm'de 5 dk santrifüj 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 200 µl'si alınarak üzerine sırasıyla, pH'ı 6,8 olan olan fosfat tamponundan 8 ml, 1 N NaOH'den 78 µl ve Ellman ayıracından ise 100 µl ilave edildi. 5 dakika sonra spektrofotometre cihazında 412nm'de köre (distile suya) karşı absorbansları okundu. Ellman solüsyonu 100 mg 5'-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic asitin (DTNB; Sigma, katalog no. D-8130) fosfat tamponunun (pH 7.8), 100 ml'sinde çözdürülmesiyle hazırlandı. GSH standardı; 15.36 mg indirgenmiş glutatyonun (Sigma, katalog no: G-4251) 1 mM $Na_2EDTA$'nın 100 ml'sinde çözdürülmesiyle hazırlandı.

Hesabı: $A_{numune} \times C_{standart}$

$A_{standart}$

$C_{numune} = A_{numune} \times 5,45$

Sonuçlar µmol/gram Hb olarak verildi.

2.3.6. Doku ve Eritrosit Glutatyon Peroksidaz Tayini

Glutatyon peroksidaz düzeyleri Cayman marka ELISA kiti (Katalog No: 703102) kullanılarak Biotek Epoch cihazında ölçüldü. GPx analizleri beyin dokusu ve kanda gerçekleştirildi. Beyin dokusunun homojenizasyonu ve eritrosit eldesi kit prosedürüne göre yapıldı.

Reaktiflerin Hazırlanması

1) GPx assay buffer: Her vial 27 ml distile su ile seyreltildi. +4º C de 6 ay stabildir.
2) GPx sample buffer: 2 ml sample buffer ile 18 ml distile su karıştırılarak hazırlandı. +4º C de 1 ay stabildir.
3) Glutatyon peroksidaz kontrol (GPx): 50 µl sığır eritrosit GPx içerir. 10 µl enzim 490 µl dilüe sample bufferle seyreltildi. Buzda 4 saat stabildir.
4) GPx Co-Substrat mixture: Liyofilize NADPH, glutatyon, ve glutatyon redüktaz içerir. 6 ml deiyonize su ile hazırlandı. Çalışma sırasında 25ºC de muhafaza edilmelidir. +4ºC de 2 gün stabildir.
5) GPx Kümen Hidroperoksit: -20ºC de muhafaza edilmeli, kullanıma hazırdır.

Çalışma Prensibi

1) İlk iki kuyucuğa 120 µl assay buffer ve 50 µl Co-substrat karışımı ilave edildi.
2) Kontrol kuyucuğuna 100 µl assay buffer, 50 µl Co-substrat ve 20 µl GPx kontrol numunesi koyuldu.
3) Numune kuyucuklarına 100 µl assay buffer, 50 µl Co-substrat ve 20 µl örnek ilave edildi.
4) Bütün kuyucuklara 20 µl kümen Hidroperoksit eklendi.
5) Kümeni koyduktan sonra birer dakika aralıklarla 5 dakika boyunca 340 nm'de absorbansları alındı.

Hesabı:

$$\text{GPx aktivitesi (nmol/dakika/ml)} = \frac{\Delta A_{340}/\text{dakika}}{0{,}00373\,\mu M^{-1}} * \frac{0{,}19\ \text{ml}}{0{,}02\ \text{ml}}$$

GPx aktivitesi prosedüre göre hesaplandıktan sonra birim dönüşümü yapılarak, sonuçlar eritrosit GPx için U/dk/g Hb ve doku için U/dk/gr protein olarak verilmiştir.

2.3.7. Doku ve Plazma Nitrik Oksit Düzeyleri Ölçümü

Nitrik oksit tayini Cayman marka kolorimetrik test kiti (katalog no: 780001) kullanılarak plazma ve beyin dokusunda gerçekleştirildi. Beyin dokusunun homojenizasyonu kit prosedürüne göre gerçekleştirildi. Nitrik oksit analizi aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

Analiz için gerekli olan kimyasalların hazırlanması

1) Nitrat assay buffer: (no:780022): 1 vial assay buffer 100 ml distile su ile dilüe edildi. Buffer $+4^0$C de 2 ay stabildir.
2) Nitrat redüktaz enzim (no: 780010) : 1,2 ml assay buffer içerisinde çözüldü. Kullanım sırasında buzda bekletildi. Hemen kullanılmadığı durumda $-20^0$C de muhafaza edilmelidir.

3) Nitrat redüktaz kofaktör (no:780012): 1,2 ml assay buffer içerisinde çözüldü. Kullanım sırasında buzda bekletildi. Hemen kullanılmadığı durumda -20$^0$C de muhafaza edilmelidir.
4) Nitrat standartları (no: 780014) : Liyofilize standart içeriği 1 ml assay buffer ile çözdürülüp, vortekslendi. Hemen kullanılmadığı durumda +4$^0$C de muhafaza edilmelidir. 5µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM, 35 µM konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı.
5)Griess Reagents R1 ve R2 (no:780018 ve 780020): Kullanıma hazırdır. +4$^0$C de muhafaza edilmelidir.

Tayinin yapılışı

Kör ve standartlar çift çalışıldı. Kör kuyucuklarına 200 µl assay buffer konuldu. Numune kuyucuklarına 80 µl ilave edildi. (numune dilusyonu assay buffer ile 1:1 oranında gerçekleştirilmiştir). 10 µl Enzim kofaktörü kör kuyucuğu hariç diğer kuyucuklara konuldu. 10 µl nitrat redüktaz mixture kör kuyucuğu hariç diğer kuyucuklara ilave edildi. Plate kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. 50 µl Griess reagents R1 ve 50 µl Griess reagents R2 kör kuyucuğu hariç diğer kuyucuklara ilave edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. 540 nm de Biotek Epoch cihazında ölçüldü.
Hesaplanması: NO değerleri µmol/ g doku olarak hesaplandı. Plazma değerleri µmol/l olarak hesaplandı.

2.3.8. Doku ve Plazma Ksantin Oksidaz Analizi

Ksantin Oksidaz analizi Cayman marka Fluorometrik test kiti kullanılarak (kat no:10010895) plazma ve beyin dokusunda gerçekleştirildi. Beyin dokusu homojenizasyonu kit prosedürüne göre yapıldı. Analiz Floresan spektrofotometre HITACHI F-7000 cihazında gerçekleştirildi.

Reaktiflerin hazırlanması

1. Ksantin oksidaz standartlarının hazırlanması: Şişe 50 mU ksantin oksidaz içerir. Vortekslendikten sonra 20µl alınarak 380 µl dilue sample buffer ilave edildi.

Kullanıncaya kadar buz içerisinde muhafaza edildi. 20µU/ml, 40 µU/ml,60 µU/ml,80 µU/ml,100 µU/ml olan standartlar hazırlandı.

2. XO assay buffer:3 ml assay buffer 27 ml distile su ile hazırlandı.1 hafta $4^0$C de muhafaza edilebilir.

3. XO sample buffer:3 ml sample buffer 27 ml distile su ile hazırlandı. 6 ay $4^0$C de muhafaza edilebilir.

4. XO detektör: Şişe liyofilize ADHP (10-asetil-3,7-dihdroksifenokzan) içerir. Assay coctail ve 200 µl dimetilsülfoksid ile muamele edildi. Hazırlanan bu dedektör 15 dakika stabildir.

5. XO Horse radish peroksidaz (HRP): Şişe liyofilize horse radish içerir. 200 µl distile su ilave edilip, 1 hafta $-20^0$C de muhafaza edilebilir.

6. DMSO assay reagent: Şişe 1 ml DMSO içerir. Kullanıma hazırdır.

Analizin Yapılışı

50 µl XO standartları ve 50 µl örnekler kuyucuklara konuldu. Plate kapatıldı. Assay kokteyli ayrı bir test tübünde 4,9 ml assay buffer, 50 µl detektör ve 50 µl HRP ile muamele edilerek 50 µl kokteyl kuyucuklara konuldu. Plate kapatılarak $37^0$ C de 45 dakika inkübe edildi. Akabinde flüoresans eksitasyonu 520 nm ve emisyon 585 nm olan cihazda ölçüm yapıldı.

Hesabı:

$$\text{XO}(\mu\text{U/ml}) = \left(\frac{(\text{Numune fluoresans}) - (\text{y})}{\text{Slop}}\right) * \text{numune dilusyonu}$$

XO prosedüre göre hesaplandıktan sonra birim dönüşümü yapılarak, doku XO sonuçları µU/g protein ve de plazma µU/g Hb şeklinde hesaplandı.

## 2.4. İstatistik

İstatistik analiz SPSS istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama ± standard sapma olarak tanımlandı. Gruplar arası 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

Çalışma gruplarına ait plazma ve doku MDA değerleri çizelge 3.1.'de verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında bu parametrenin iskemi-reperfüzyon gerçekleştirilen 2. grup ile iskemi+reperfüzyonu ilaç uygulamasının yapıldığı 5. grupta, diğer gruplara göre hem plazma hem de dokuda önemli artış gösterdiği belirlendi (Plazma için P<0.005; doku MDA için P<0.001).

Çizelge 3.1. Plazma ve Doku MDA Miktarları

| **Gruplar** | **Plazma MDA (nmol/ml)** | **Doku MDA (nmol/gr doku)** |
|---|---|---|
| **1- Sham-Kontrol** | 4.22±1.11 **B** | 9.15±1.11 **B** |
| **2-İskemi-Reperfüzyon** | 5.74±0.86 **A** | 13.37±2.34 **A** |
| **3-DiOHF + İskemi-Reperfüzyon** | 3.89±0.75 **B** | 10.63±1.50 **B** |
| **4-İskemi + DiOHF + Reperfüzyon** | 3.76±0.87 **B** | 10.69±1.51 **B** |
| **5-İskemi + Reperfüzyon + DiOHF** | 5.04±1.13 **A** | 15.42±3.52 **A** |

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

Deney gruplarının plazma ve doku NO seviyeleri çizelge 3.2'de verildi. Plazma NO düzeyleri incelendiğinde bu parametrenin 2. grup olan iskemi-reperfüzyon grubunda önemli oranda artış gösterdiği tespit edildi (P<0.002). Doku NO değerlerinin ise plazmaya benzer şekilde 2. grupta önemli artış gösterdiği görüldü. Ancak iskemi-reperfüzyon öncesi, iskemiden hemen sonra ve iskemi reperfüzyon sonrası DiOHF uygulaması artan NO değerlerini önemli şekilde baskıladı (P<0.001).

Çizelge 3.2. Plazma ve Doku NO Seviyeleri

| **Gruplar** | **Plazma NO (µmol/l)** | **Doku NO (µmol/gr doku)** |
|---|---|---|
| **1- Sham-Kontrol** | 15.45±1.16 **B** | 4.67±0.63 **B** |
| **2-İskemi-Reperfüzyon** | 23.12±0.92 **A** | 6.20±0.56 **A** |
| **3-DiOHF + İskemi-Reperfüzyon** | 16.23±1.77 **B** | 4.15±0.43 **C** |
| **4-İskemi + DiOHF + Reperfüzyon** | 15.73±1.99 **B** | 3.74±0.50 **C** |
| **5-İskemi + Reperfüzyon + DiOHF** | 14.61±1.10 **B** | 3.57±0.50 **C** |

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistik olarak önemlidir. (Plazma NO için P<0.002; doku NO için P<0.001).

Çalışmanın plazma ve doku XO seviyeleri çizelge 3.3'de sunuldu. Bu parametrenin hem plazma (P<0.001) hem de beyin dokusunda iskemi-reperfüzyon yapılan 2. grupta diğer gruplara göre önemli şekilde artış gösterdiği (P<0.05) ancak diğer gruplar arası karşılaştırma yapıldığında önemli bir farklılığın olmadığı belirlendi.

Çizelge 3.3. Plazma ve Doku XO Değerleri

| **Gruplar** | **Plazma XO (µU/g Hb)** | **Doku XO (µU/gr protein)** |
|---|---|---|
| **1- Sham-Kontrol** | 1.03±0.71 **B** | 12.03±1.52 **B** |
| **2-İskemi-Reperfüzyon** | 2.69±0.27 **A** | 14.61±1.28 **A** |
| **3-DiOHF + İskemi-Reperfüzyon** | 0.52±0.24 **C** | 10.97±1.65 **C** |
| **4-İskemi + DiOHF + Reperfüzyon** | 0.38±0.15 **C** | 11.59±1.67 **C** |
| **5-İskemi + Reperfüzyon + DiOHF** | 0.34±0.08 **C** | 12.22±2.56 **B** |

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistik olarak önemlidir. (Plazma XO için P<0.001; doku XO için P<0.05).

Çalışma gruplarının eritrosit ve doku GSH değerleri çizelge 3.4'de verildi. Eritrosit GSH değerleri incelendiğinde bu parametrenin sadece iskemi-reperfüzyon yapılan ancak başka bir uygulamanın yapılmadığı 2. grupta en düşük seviyede

olduğu görüldü (P<0.002). Eritrosit GSH değerleri açısından diğer gruplar arasında herhangi bir farklılık yoktur. Doku GSH seviyeleri incelendiği zaman bu parametrenin sham kontrol grubuna göre iskemi-reperfüzyon grubunda (grup 2) önemli bir değişiklik göstermediği, ancak iskemiden hemen önce ve sonra DiOHF uygulaması yapılan 3. ve 4. gruplarda diğer gruplara göre önemli şekilde artış gösterdiği belirlendi (P<0.005). Ancak reperfüzyon sonrası bu ilacın uygulaması eritrosit ve doku GSH değerlerini önemli şekilde etkilemedi.

Çizelge 3.4. Eritrosit ve Doku GSH Düzeyleri

| **Gruplar** | **Eritrosit GSH (µmol/gram Hb)** | **Doku GSH (µmol/gr protein)** |
|---|---|---|
| **1- Sham-Kontrol** | 30.63±3.20 **A** | 49.81±5.62 **B** |
| **2-İskemi-Reperfüzyon** | 22.33±1.00 **B** | 52.99±9.05 **B** |
| **3-DiOHF+ İskemi - Reperfüzyon** | 35.80±2.20 **A** | 61.74±4.14 **A** |
| **4-İskemi+DiOHF + Reperfüzyon** | 41.54±5.36 **A** | 61.91±1.20 **A** |
| **5- İskemi + Reperfüzyon + DiOHF** | 40.64±3.65 **A** | 49.97±3.39 **B** |

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

Deney gruplarının plazma ve doku GPx değerleri çizelge 3.5'de verilmiştir. Bu parametrenin plazma seviyesi sham-kontrol grubuna göre iskemi-reperfüzyon grubunda herhangi bir değişiklik göstermemiştir. Ancak iskemi-reperfüzyon öncesi ve sonrasında DiOHF uygulaması bu değeri iskemi-reperfüzyon ve sham gruplarına göre önemli şekilde artırmıştır (P<0.05). Doku GPx değerlerinin ise iskemi-reperfüzyon grubunda azalırken, DiOHF uygulaması azalan GPx değerlerini normalleştirmiştir (P<0.05).

Çizelge 3.5. Plazma ve Doku GPx- Değerleri

| Gruplar | Eritrosit GPx (U/dk/g Hb) | Doku GPx (U/dk/g protein) |
|---|---|---|
| **1- Sham-Kontrol** | 204.65±51.38 **B** | 101.74±30.83 **A** |
| **2-İskemi-Reperfüzyon** | 247.34±46.10 **B** | 63.12±30.87 **B** |
| **3-DiOHF + İskemi-Reperfüzyon** | 306.65±45.52 **A** | 108.37±39.75 **A** |
| **4-İskemi + DiOHF + Reperfüzyon** | 346.74±61.60 **A** | 116.27±31.16 **A** |
| **5-İskemi + Reperfüzyon + DiOHF** | 378.99±64.83 **A** | 126.95±44.83 **A** |

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistik olarak önemlidir (Plazma ve doku GPx için $P<0.05$).

## 4. TARTIŞMA

Gerçekleştirilen çalışmada sıçanlarda her iki karotid arterin 20 dakika süreyle oklüzyonuyla oluşturulan serebral iskemiye bağlı olarak önemli düzeyde oksidatif hasar oluştuğu, araştırmada incelenen parametreler olan MDA, XO ve NO'nun hem plazma hemde beyin korteks dokusunda belirgin şekilde artışıyla ortaya konulmuştur. Ancak kullanılan DiOHF'nin bahsedilen bu oksidan molekülleri azalttığı ve antioksidanlar olan GSH ve GPx seviyelerini ise özellikle iskemiden hemen önce ve iskemi sonrası uygulamasıyla artırdığı görülmektedir.

İskemi ve reperfüzyon uygulama süresi ve şekline bağlı olarak organlarda belirgin şekilde hasar ve fonksiyon kaybına yol açabilir. Oluşan hasar özellikle azalmış vazodilatatör kaynaklardan ortaya çıkmaktadır (Hearse ve ark 1993, Sobey ve Woodman 1993). İskemi ve reperfüzyon azalmış vazodilatatör kaynaklara bağlı olarak iskeminin oluştuğu bölgede damar ve organlarda hasara neden olur (Hearse ve ark 1993, Sobey ve Woodman 1993). Damarların gevşetici etkilerindeki azalma lökositlerin damarlara yapışmasından ve bunu takiben en küçük bölgelerdeki dolaşımı sağlayan kapillerdeki tıkanmadan oluşur ve bu kavram; akımın gerçekleşmediği fenomen olarak tanımlanır (Reffelmann ve Kloner 2006). Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin hızlı bir şekilde ortaya çıkmasıyla lökositlerdeki aktivasyon ve yapışma artar. Sonuçta reperfüzyona uğrayan doku azalmış kanlanma ve hipoksiden ciddi bir şekilde etkilenir. İskemi-reperfüzyon yaralanması bir seri toksik olayların uyarımıyla şekillenerek sonuçta lipidler, protein ve DNA'da hasar oluşturan oldukça reaktif moleküllerin fazla miktarda serbestlenmesine yol açar (Aruna Devi ve ark 2010).

Çalışmada beyin dokusunda iskemi-reperfüzyon oluşturmak amacıyla sıçanların her iki karotid arteri 20 dakika süreyle klemplendi. Daha sonra ise 7 gün süreyle reperfüzyona izin verildi. Daha önce yapılan çalışmalarda DiOHF'nin özellikle kalp dokusunda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak 7 güne kadar etkin bir fayda sağladığı ortaya konulmuştur (Chan ve ark 2003, Woodman ve Chan 2004 Challa ve ark 2011). Bizim çalışmamızda ise bu maddenin beyin dokusundaki koruyucu etkinliğini incelemek için bahsedilen molekül iskemi öncesi, iskemiden

hemen sonra ve reperfüzyon sonrası olmak üzere üç farklı şekilde kullanılmak suretiyle beyin dokusundaki lipid peroksidasyonuna olan etkisi incelendi.

Öncelikle kan ve beyin dokusunda oksidatif hasarın göstergelerinden olan MDA değerleri incelendiğinde bu parametrelerin özellikle 20 dakika süreli iskemiye ve takiben reperfüzyona bağlı olarak belirgin şekilde artış gösterdiği tespit edildi.

Oksidatif stres beyin dahil birçok organın iskemi-reperfüzyon yaralanmasının patogenezinde büyük bir rol oynar (Abd-Elsameea ve ark 2014). MDA lipid peroksidasyonunun güvenilir göstergelerinden birisi olarak dikkate alınır (Abdel Salam ve ark 2012). Daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada kısa süreli beyin I/R yaralanmasının beyin dokusundaki MDA düzeylerini sham kontrol grubuna göre önemli şekilde artırmış olması bizim elde ettiğimiz artan MDA düzeylerini desteklemektedir (Aras ve ark 2014, Shao ve ark 2014). Ono ve ark (2009) gerçekleştirdiği bir çalışmada ise önbeyin iskemi–reperfüzyonunda beyin dokusu ve kanda MDA seviyelerini önemli şekilde artırdığı rapor edilmiştir. Araştırmamızda gerek kan da gerekse beyin korteks dokusunda artan MDA seviyeleri yukarıdaki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Araştırmamızda iskemiden önce (1 saat) ve iskeminin bitiminde DiOHF uygulaması (grup 3 ve 4) iskemi-reperfüzyon hasarının göstergelerinden birisi olan MDA seviyeleri kan dokusu ve beyinde önemli şekilde baskılayıp sham grubu seviyesine düşürmüştür. Yaidikar ve ark (2014) çalışmasında bir flavonid kullanımının serebral beyin iskemi hasarında MDA üretimini baskılama suretiyle doku koruyucu etkisinin ortaya konulması bizim araştırmamızı desteklemektedir. Ancak iskeminin bitiminde kısa süreli kan akımına izin verdikten sonra (20 dakika) uzun süreli reperfüzyonda kan ve dokuda artan MDA düzeyleri üzerine bir etkisi olmamıştır.

Mevcut araştırmada oksidan hasarın göstergelerinden XO seviyeleri de benzer şekilde kan ve beyin dokusunda incelenmiştir. Bu parametrenin ilaç uygulamasının yapılmadığı iskemi-reperfüzyon grubunda (grup 2) önemli şekilde arttığı görüldü. Bununla birlikte iskemi öncesi ve bitiminde DiOHF verilmesi bahsedilen artmış parametreyi belirgin şekilde baskıladı. Önceden gerçekleştirilen beyin iskemi-reperfüzyon çalışmalarında XO'nın iskemi-reperfüzyona bağlı olarak arttığı belirlenmiştir (Ghoneim ve ark 2002, Ghosh ve ark 2013). Ancak bahsedilen

çalışmalarda yapısında flavonoid bulunan kurkumin ve quercetinin iskemi-reperfüzyan bağlı olarak artan XO düzeylerini baskıladığı ortaya konulmuştur. İlhan ve ark (2004) gerçekleştirdiği çalışmada da benzer şekilde I/R'nin XO'yu artırdığı tespit edilmiştir. Chen ve ark (2014) araştırmasında ise iskemik beyinde XO'nun yapımının uyarıldığı ifade edilmiştir. Beyin iskemi-reperfüzyonunda XO inhibitörü olan alluprinolun iskemi-reperfüzyon sonunda artan XO seviyelerini belirgin olarak baskıladığı belirtilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz araştırmada ise sentetik bir flavonoid olan DiOHF'nin 10 mg/kg şeklinde iskemi-reperfüzyon öncesi ve iskemi bitimi-kısa süreli reperfüzyondan (20 dakika) hemen sonra verilmesi uzun süreli reperfüzyonu takiben bile (7 gün) plazma ve beyin dokusundaki artan XO seviyelerini önemli şekilde baskıladığını ortaya koymaktadır.

Oksidan parametrelerden olan NO düzeyleri de plazma ve beyin dokusunda incelendi. NO seviyelerinin ilaç uygulamasının yapılmadığı 2. grupta diğer gruplara göre belirgin şekilde arttığı tespit edildi. Ancak DiOHF uygulaması artan NO düzeylerini beyin dokusunda daha fazla olmak üzere plazmada da baskıladı. Nitrik oksidin serbest oksijen radikalleriyle etkileşimi ve antioksidan özellikleri ile ilgili araştırmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Süperoksidi bağladığı için NO'nun serbest radikalleri temizleyen koruyucu bir faktör olduğu düşünülmektedir. Genellikle kalp iskemi-reperfüzyon çalışmalarında DiOHF kullanımının NO bioyararlanımını artırararak doku da koruyucu etki gösterdiği ifade edilmiştir (Chan ve ark 2003). Reperfüzyonun başlangıcında serbest bırakılan yoğun reaktif oksijen türlerinin hücre yaralanması ve doku ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark 2011). Ancak reperfüzyon sırasında salınan NO'nun önkoşullanma mekanizmalarında koruyucu etkiye sahip olduğu da öne sürülmektedir (Wang ve ark 2011). Bununla birlikte nitrik oksit sentezinin uyarılması vasküler endoteliyal yangıya neden olarak ilgili dokuda hasarı artırabilir (Wang ve ark 2014). Xu ve ark (2013) araştırmasında bir flavonoid türü olan baicalin'in nitrik oksiti temizlemek suretiyle nöron koruyucu etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Yaidikar ve ark (2014) çalışmasında ise fokal serebral iskemiye bağlı olarak oluşan hasarın başka bir flavonoid ile NO üretinin baskılanmasıyla önlendiği rapor edilmiştir. Guo ve ark (2008) gerçekleştirdiği çalışmada flavonların beyinde nitrik oksit üretimini düzenlemek suretiyle koruyucu etki oluşturduğu belirlenmiştir. Bahsedilen çalışmada flavon uygulamasında 7-10 gün sonra bile koruyucu etki oluşturduğunu tespit

etmeleri bizim araştırmamızda elde ettiğimiz 7 gün reperfüzyonda sonra azalan NO düzeylerini desteklemektedir.

Araştırmada antioksidan sistemin göstergelerinden birisi olarak eritrosit ve doku glutatyon düzeyleri de değerlendirilmiştir. Plazma ve beyin dokusu glutatyon düzeyleri incelendiğinde bu parametrenin eritrositlerde sadece iskemi-reperfüzyonun yapıldığı 2. grupta eritrositlerdeki miktarı önemli şekilde azalmıştır. Doku düzeyinde ise sham grubuyla karşılaştırıldığında istatitistik düzeyde olmasa bile çok küçük oranda arttığı görüldü. Ancak iskemi-reperfüzyon öncesi DiOHF uygulaması hem plazma hem de dokudaki GSH seviyelerini sham-kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin olarak artırmıştır. Benzer artışlar iskeminin bitiminde DiOHF takviyesinin yapıldığı 4. grupta da elde edilmiştir. Ancak uzun süreli reperfüzyon öncesi ilacın uygulandığı 5. grupta gerek eritrosit gerekse dokuda GSH seviyeleri kontrol grubuna göre değişiklik göstermemiştir. Glutatyon hücreleri oksidan hasara karşı koruyan hücre içindeki en önemli antioksidan bileşiklerden birisidir (Ross 1988). Organizmada antioksidan savunmanın önemli elemanlarından birisi olarak kabul edilir. Al-Majed ve ark. (2006) gerçekleştirdiği bir araştırmada 10 dakika geçici beyin iskemisi ve takiben 7 gün süreli reperfüzyon yapılmış ve bahsedilen araştırmada GSH seviyeleri azalmış olup bizim çalışmamızı desteklemektedir. Benzer başka bir çalışmada da önbeyin iskemisine bağlı olarak GSH miktarının azaldığı tespit edilmiştir (Al-Omar ve ark 2006). Ancak bahsedilen araştırmada azalan GSH düzeyleri bir flavonoid türü olan kurkumin tedavisi ile tekrar artış göstermiştir. Hatta bu düzelmenin iskemiden 7 gün sonra gerçekleştiği rapor edilmiştir. Aksine Ghoneim ve ark (2002) çalışmada ise kurkumin takviyesinin GSH seviyelerini etkilemediği rapor edilmiştir. Mukherjee ve ark (2007) yaptığı çalışmada ise 30 dakika iskemi ve 24 saat süreli reperfüzyonun değişik beyin bölgelerindeki GSH'ı tükettiği ortaya konulmuştur. Cosar ve ark (2014) gerçekleştirdiği çalışmada sıçanlarda 45 dakikalık iskemiye bağlı olarak GSH düzeylerinin azaldığını belirlemişlerdir. Bahsedilen çalışmalara bir bütün olarak bakıldığında iskemiye bağlı olarak GSH düzeylerinin önemli şekilde baskılandığının görülmesi bizim çalışmamızda elde ettiğimiz azalmış eritrosit GSH düzeyleriyle benzerlik göstermektedir. Ancak araştırmamızda beyin dokusundaki GSH düzeyleri sadece iskemi-reperfüzyonun yapıldığı grupta sham-kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli bir farklılık göstermemiştir. Hatta çok

küçük de olsa artmıştır. Bu artışın dokunun ortaya koyduğu antioksidan aktiviteden kaynaklanması mümkündür. Ancak dokudaki GSH uzun süreli reperfüzyon azalma göstermiştir. Bu da kullanılan DiOHF'nin oluşturduğu etkinin ilacın uygulama zamanına göre farklı etki oluşturmasından kaynaklanması mümkündür. Nitekim daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda DiOHF özellikle iskemi öncesi ve reperfüzyonda hemen önce kullanımının antioksidan etkinliğinin daha belirgin olduğu ve bu doku koruyuculuğunun reperfüzyon 7 gün sonra bile devam ettiğinin rapor edilmesi bizim bulgularımızı destekler niteliktedir (Woodman ve Chan 2004, Wang ve ark. 2009).

Araştırmamızda lipid peroksidasyonuna karşı korunmayı sağlayan antioksidanlardan birisi olan GPx değerleri plazma ve beyin korteks dokusunda incelendi. GPx eritrositlerde strese karşı en etkili oksidanlardan olup fagositik hücrelere önemli görevler yapar (Lunec ve Blake 1990). Daha önce yapılan deneysel beyin iskemi-reperfüzyon çalışmalarında GPx düzeylerinin nasıl etkilendiği çok sayıdaki çalışmada incelenmiştir. İskemi ve reperfüzyon çalışmalarında GPx düzeylerinin farklı şekillerde etkilendiği görülmektedir. Selvaraj ve ark'nın (2010) deneysel miyokardiyal iskemi çalışmalarında sıçanların kalp dokusunda GPx değerlerinin azaldığını rapor etmişlerdir. Ancak gerçekleştirilen başka bir araştırmada ise mezenterik iskemi reperfüzyon hasarının bağırsak, karaciğer, böbrek ve akciğer gibi dokularda GPx değerlerini artırdığı tespit edilmiştir (Sızlan ve ark 2009). Sun ve ark (2010) ve Xu ve ark (2011) gerçekleştirdiği çalışmalarda fokal serebral iskemiye bağlı olarak iskemiden sonra beyin dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesinin azaldığını belirlemişlerdir. Başka benzer çalışmalarda elde edilen bulgular GPx seviyelerinin genel olarak iskemi-reperfüzyon sonucu baskılandığı şeklindedir (Cai ve ark 2007, Guo ve Chen 2008, Muley ve ark. 2012, Shi ve ark 2013).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise GPx değerlerinin plazmada sham-kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik göstermediği ancak dokuda iskemi-reperfüzyona bağlı olarak önemli şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Gerek plazma ve gerekse dokuda bahsedilen parametre DiOHF uygulamasının yapıldığı bütün gruplarda artış göstermiştir. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda flavonoidlerin güçlü bir antioksidan ve doku koruyucu etkilere sahip olduğu farklı organlarda belirlenmiştir (Aruna Devi ve ark 2010, Cao ve ark 2011, Wang ve ark 2011). Flavonoidler

oldukça güçlü antioksidan etkilerine paralel olarak oksidanların üretimini de önleyebildiği ifade edilmektedir (Akhlaghi ve Bandy 2009). Bunlara ilave olarak anti-inflamatuvar ve antiagregasyon özellikleriyle ilgili enzimler ve sinyal yolunu baskılayarak oksidan üretimini azalttığı ve iskemi bölgesinde kan akımının yeniden daha iyi bir şekilde kurulmasını sağladığı belirtilmiştir (Akhlaghi ve Bandy 2009). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada ise sentetik flavonoid olan DiOHF uygulamasının beyin dokusunda ve kanda GPx aktivitesini artırmak suretiyle lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağladığını belirledik. DiOHF kullanımı hem iskemi hem de reperfüzyonda kan ve dokuda ki GPx seviyelerini önemli şekilde artırmış olup farklı araştırma gruplarının değişik organlarda flavonoid kullanımıyla elde ettiği bulgulara paralellik göstermektedir.

Araştırmanın sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde sıçanlarda 20 dakika süreli iskemi ve takiben uzun süreli reperfüzyona bağlı olarak kan ve beyin dokusunda lipid peroksidasyonun arttığını belirledik. Bununla birlikte 20 mg/kg dozda intraperitoneal DiOHF uygulamasının genel olarak oksidan aktiviteyi baskılarken antioksidan aktiviteyi uyardığını tespit ettik. Ancak bahsedilen ilacın özellikle iskemi- reperfüzyon öncesi ve iskemiden hemen sonra uygulanmasının daha belirgin bir etki sağlayabileceğini ancak farklı deney grupları ve uygulama şekli ile bu aktivitenin daha geniş bir şekilde ortaya konulabileceği söylenebilir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Gerçekleştirilen çalışmada sıçanlarda 20 dakika süreyle her iki karotid arterin klemplenmesi suretiyle kan akımının kesilmesiyle iskemi ve ardından belli sürelerde kan akımını yeniden sağlamakla reperfüzyon oluşturulmuştur. İskemi-reperfüzyonun beyinde oluşturduğu hasarın göstergesi olarak MDA, NO ve XO'nun plazma ve kandaki düzeyleri artarken antioksidanlar olan GSH ve GPx seviyeleri ise kan ve beyin dokusunda önemli şekilde baskılanmıştır. Ancak iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu düşünülen DiOHF'nin özellikle iskemi öncesi ve iskemiden hemen sonra reperfüzyon öncesi kullanımı özellikle doku GSH düzeylerini artırırken artan MDA seviyelerini baskılamıştır. Ancak oksidanlar olan XO ve NO düzeyleri DiOHF uygulaması sonucu reperfüzyondan sonra bile önemli şekilde azalma göstermiştir. Çalışmanın sonuçları kullanılan ilacın oksidan ve antioksidanları farklı şekilde etkilemek suretiyle beyin iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu bir etki oluşturduğunu göstermektedir.

Daha sonra gerçekleştirilecek araştırmalarda iskemi-reperfüzyon süresindeki değişmelerle birlikte farklı dozda kullanılacak olan bu molekülün aynı zamanda beyin infarkt alanına olan etkisinin de belirlenmesi doku düzeyinde oluşan hasarda bu ilacın etkinliğinin daha iyi bir şekilde ortaya konulmasını sağlayacaktır.

Bunlara ilave olarak çalışmada kullanılan DiOHF hem oksidanları baskılayarak hemde antioksidanların etkisini artırmak suretiyle deneysel iskemi reperfüzyonda lipid peroksidasyona karşı koruyucu etkiye sahip olduğu görülmektedir. Daha fazla deney grupları ile farklı süre ve uygulama şekilleriyle birlikte bu ilacın verilmesinin oluşturacağı doku koruyucu etkisinin daha iyi bir şekilde ortaya konulması sağlanabilecektir.

# 6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## Sıçanlarda Beyin İskemi-Reperfüzyon Hasarında 3',4'-Dihydroxyflavonol'un Lipid Peroksidasyonuna Etkisi

**Merve ÇALIŞKAN**

**Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2014**

Mevcut çalışmanın amacı sentetik bir flavonoid olan ve iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu olduğu belirlenen 3',4'-dihydroxyflavon'un sıçanlarda deneysel beyin iskemi-reperfüzyonunda lipid peroksidasyonuna etkisini belirlemekti.

Mevcut çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen ortalama olarak 350-400 gr ağırlığında olan 34 adet erkek Wistar-albino türü sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Çalışmada deney grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu.

1-Sham; 2-İskemi-Reperfüzyon; Anestezi yapılan hayvanlarda karotid arterler klemplenmek suretiyle 20 dakika iskemi oluşturulacak takiben reperfüzyon (7 gün), 3-DiOHF + İskemi + Reperfüzyon grubu (n=7) : İskemi-reperfüzyondan bir saat önce DiOHF 10 mg/kg olarak periton içi hayvanlara uygulandı. 4-İskemi + DiOHF (10 mg/kg) + Reperfüzyon grubu (n=7); 5-İskemi + Reperfüzyon + DiOHF.

Deney gruplarında uygulamaların bitiminde anestezi edilen hayvanlardan kan örnekleri ve beyin korteks dokuları alınarak analiz yapılıncaya kadar -80$^{o}$C'de tutuldu.

Kan MDA düzeyleri ($P<0.005$) ve doku MDA seviyeleri iskemi-reperfüzyon grubunda önemli şekilde arttı ($P<0.001$). Ancak bu değerler iskemi ve reperfüzyondan hemen önce DiOHF uygulaması ile önemli şekilde baskılandı. İskemi-reperfüzyona bağlı olarak artan plazma ve doku XO ve NO değerleri de DiOHF uygulası ile belirgin olarak azaldı. Deney hayvanlarına DiOHF verilmesi antioksidanlar olan GSH ve GPx'i sadece iskemi-reperfüzyon yapılan gruplara göre artırdı.

Çalışmanın sonuçları sıçanlara beyin iskemi-reperfüzyon hasarına karşı DiOHF uygulamasının önemli bir koruma sağladığını göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Beyin iskemi reperfüzyonu; GPx; Rat; 3',4'-Dihydroxyflavonol; XO

# 7. SUMMARY

## The effect of 3',4'-Dihydroxyflavonol on Lipid Peroxidation in Brain Ischemia-Reperfusion Damage in Rat


The aim of present study was to determine the effect of 3',4'-dihydroxyflavonol on lipid peroxidation in experimental brain ischemia-reperfusion in rats.

Present study was performed on the 34 male Wistar –albino rat, weigth 350-400 gr which obtain fron Necmettin Erbakan University, Kombassan Experimental Medicine Rearch and Application Center. Experiment groups as follows:

1-Sham; 2-Ischemia-reperfusion; animal were anesthesized and carotid arteried were clemped for 20 minutes and reperfusion (7 days). 3-DiOHF + Ischemia-reperfusion; DiOHF was given to animals as 10 mg/kg by intraperitoneal. 4- Ischemia + DiOHF + Reperfusion; 5- Ischemia-reperfusion + DiOHF.

Animals were anesthesized blood and brain cortex samples were taken and stored in -80$^{o}$C by analyses.

Blood MDA ($P<0.005$) ve tissue MDA levels were significantly higher ischemia-reperfusion groups ($P<0.001$). However, these increased levels were inhibited by DiOHF that given just before ischemia and reperfusion. Ischemia-reperfusion led to increased XO and NO but DiOHF application reduced NO and XO. DiOHF increased GSH and GPx levels compared to ischemia-reperfusion group (group 2).

The results of present study show that DiOHF supplementation by intraperitoneal has protective affect to brain ischaemi-reperfusion damage in rat.



**Anahtar Sözcükler:** Brain ischemia-reperfusion; GPx; Rat; 3',4'-Dihydroxyflavonol; XO

# 8. KAYNAKLAR


1. Abdel-Salam OM, Youness ER, Mohammed NA, Abd-Elmoniem M, Omara E, Sleem AA. Neuroprotective and hepatoprotective effects of micronized purified flavonoid fraction in lipopolysaccharide-treated rats. Drug Discov Ther. 2012;6(6):306-14.

2. Abd-Elsameea AA, Moustaf AA, Mohamed AM. Modulation of the oxidative stress by metformin in the cerebrum of rats exposed to global cerebral ischemia and ischemia/reperfusion.Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014;18(16):2387-92.

3. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafariet K. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stres in rat submandibular saliva. Comp Biochem Physol C. 2003;135:331-6.

4. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. Med Sci Monit. 2004;10:141-7.

5. Aebı K, Satoshi Y, Kogure K. Strong attenuation of ischemic and postischemic brain edema in rats by a novel free radical scavenger. Stroke. 1988;19:480-5.

6. Akhlaghi M, Bandy B.Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol. 2009;46(3):309-17.

7. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. Int J Stroke. 2009;4(6):461-701

8. Al-Majed AA1, Al-Omar FA, Nagi MN. Neuroprotective effects of thymoquinone against transient forebrain ischemia in the rat hippocampus. Eur J Pharmacol. 2006;543(1-3):40-7.

9. Al-Omar FA, Nagi MN, Abdulgadir MM, Al Joni KS, Al-Majed AA. Immediate and delayed treatments with curcumin prevents forebrain ischemia-induced neuronal damage and oxidative insult in the rat hippocampus. Neurochem Res. 2006;31(5):611-8.

10. Aras M, Altaş M, Meydan S, Nacar E, Karcıoğlu M, Ulutaş KT, Serarslan Y. Effects of ebselen on ischemia/reperfusion injury in rat brain. Int J Neurosci. 2014;124(10):771-6.

11. Aruna Devi R, Lata S, Bhadoria BK, Ramteke VD, Kumar S, Sankar P, Kumar D, Tandan SK. Neuroprotective effect of 5,7,3',4',5'-pentahydroxy dihydroflavanol-3-O-(2"-O-galloyl)-beta-D-glucopyranoside, a polyphenolic compound in focal cerebral ischemia in rat. Eur J Pharmacol. 2010;626(2-3):205-12.

12. Bathe OF, Chow AWC, Phang PT. Splachnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. Surgery. 1998;123:1: 79-88.

13. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoid as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. Methods in Enzimology. 1990;186:343-55.

14. Burtis CA, Ashwood AR, Bruns DE. Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. St Louis.Elsevier Saunders.2006.

15. Cai F, Li C, Wu J, Min Q, Ouyang C, Zheng M, Ma S, Yu W, Lin F.Modulation of the oxidative stress and nuclear factor kappaB activation by theaflavin 3,3'-gallate in the rats exposed to cerebral ischemia-reperfusion. Folia Biol. 2007;53(5):164-72.

16. Cao D, Li H, Yi J, Zhang J, Che H, Cao J, Yang L, Zhu C, Jiang W. Antioxidant properties of the mung bean flavonoids on alleviating heat stress. PLoS One. 2011;6(6):21071.

17. Challa SR, Akula A, Metla S, Gopal PN. Partial role of nitric oxide in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against ischemia-reperfusion injury in normal and diabetic rats. Indian J Exp Biol. 2011;49(3):207-10.

18. Chan EC, Drummond GR, Woodman OL. 3',4'-dihydroxyflavonol enhances nitric oxide bioavailability and improves vascular function after ischemia and reperfusion injury in the rat. J Cardiovasc Pharmacol. 2003;42(6):727-35.

19. Chen G, Yang J, Lu G, Guo J, Dou Y.Limb remote ischemic post-conditioning reduces brain reperfusion injury by reversing eNOS uncoupling. Indian J Exp Biol. 2014;52(6):597-605.

20. 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.

21. Cosar M, Kaner T, Sahin O, Topaloglu N, Guven M, Aras AB, Akman T, Ozkan A, Sen HM7, Memi G, Deniz M. The neuroprotective effect of Sulindac after ischemia-reperfusion injury in rats. Acta Cir Bras. 2014;29(4):268-73.

22. Das S, Mandal AK, Ghosh A, Panda S, Das N, Sarkar S. Nanoparticulated quercetin in combating age related cerebral oxidative injury. Curr Aging Sci. 2008;1(3):169-74.

23. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidan defense system: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. Am. J. Clin. Nutr. 1991;53:194-200.

24. Diplock, A. Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series. 1998;59.

25. Eiserich JP, Patel RP, OÕDonnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. Mol Aspects Med. 1998;19:221-57.

26. Elliot, J.G. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. Food Tech. 1999;53(2):46-48.

27. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1959;82:1:70–77.

28. Ertan T, Soran A, Kılıc M, Aşlar AK, Koc M, Cengiz O. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) önemi. Cerrahi Tıp Bulteni. 2001;2:4:154-67.

29. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Fd Chem Toxic. 1995;33(12):1061-80.

30. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stres in male reproductive tissues. Asian J Androl 2003;5:231-42.

31. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. Reprod Biol. 2005;3:43.

32. Gaur V, Aggarwal A, Kumar A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain. Eur J Pharmacol. 2009;616(1-3):147-54.

33. Gaur V, Kumar A. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. Pharmacol Rep. 2010;62(4):635-48.

34. Ghoneim AI, Abdel-Naim AB, Khalifa AE, El-Denshary ES. Protective effects of curcumin against ischaemia/reperfusion insult in rat forebrain. Pharmacol Res. 2002;46(3):273-9.

35. Ghosh A, Sarkar S, Mandal AK, Das N. Neuroprotective role of nanoencapsulated quercetin in combating ischemia-reperfusion induced neuronal damage in young and aged rats. PLoS One. 2013;19:8(4):e57735.

36. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res. 2000;39:1529-42.

37. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. British J of Surgery. 1994;81:637-47.

38. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. Free Radic Res Commun. 1989;7:255-64.

39. Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. Biochem. Pharmacol. 1987;36(3):317-22.

40. Guo Y, Chen ZW. Protective effects of total flavones of rhododendra on cerebral ischemia reperfusion injury. Am J Chin Med.2008;36(2):343-54.

41. Gupta YK, Briyal S. Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. Indian J Physiol Pharmacol. 2004;48(4):379-94.

42. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem.1995;41:1819-28.

43. Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. Neurol Clin. 2006;24(1):1-21.

44. Hearse DJ, Maxwell L, Saldanha C, Gavin JB. The myocardial vasculature during ischemia and reperfusion: a target for injury and protection. J Mol Cell Cardiol. 1993;25(7):759-800.

45. 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.

46. Horst G.J. Clinical pharmacology of cerebral ischemia. Totowa New Jersey. 1997;1-31.

47. Ikizler M, Erkasap N, Dernek S, Kural T, Kaygisiz Z. Dietary polyphenol quercetin protects rats hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment. Anadolu Kardiol Derg. 2007;7:404-10.

48. Ilhan A, Yilmaz HR, Armutcu F, Gurel A, Akyol O.The protective effect of nebivolol on ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2004;28(7):1153-60.

49. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. Annu Rev Med. 1991;42:225-46.

50. Jiang F, Guo N, Dusting GJ.Modulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase expression and function by 3',4'-dihydroxyflavonol in phagocytic and vascular cells. J Pharmacol Exp Ther. 2008;324(1):261-9.

51. Kalender S, Kalender Y, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıkgöz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. Toxicology. 2002;202:227-35.

52. Kalff JC, Carlos TM, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. Gastroenterology. 1999;117:378-87.

53. Karihtala P, Soini Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. APMIS. 2007;115:81-103.

54. Koc S, Isgor BS, Isgor YG, Shomali Moghaddam N, Yildirim O. The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. Pharm Biol. 2014;1-6.

55. Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. Ann Surg. 1995;221:220-35.

56. Kuraiwa T, Bonnekoh P, Hossman K. Prevention of postischemic hypertermia prevents ischemic injury of CA1 neurons in gerbils. J Cereb Blood flow Metab. 1990;10:550-6.

57. Larson RA. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry. 1988;27(4);969-978.

58. Lavelli V, Peri C and Rizzola A. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. J. Agric. Food Chem. 2000;48(5):1442-48.

59. Li H, Yan Z, Zhu J, Yang J, He J. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by improving brain energy metabolism and alleviating oxidative stress in rats. Neuropharmacology. 2011;60(2-3):252-8.

60. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to ınjury. Schwartz SI, Principles of Surgery. Mc Graw-Hill 7th Edition. 1999;I:13-32.

61. Lunec J, Blake D. Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes. Balliere. 1990;189-212.

62. Ma B, Li M, Nong H, Shi J, Liu G, Zhang J.Protective effects of extract of Coeloglossum viride var. bracteatum on ischemia-induced neuronal death and cognitive impairment in rats. Behav Pharmacol. 2008;19(4):325-33.

63. Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem. 2005;16:577-586.

64. 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.

65. Mogulkoc R, Baltaci AK, Oztekin E, Aydin L, Sivrikaya A. Melatonin prevents oxidant damage in various tissues of rats with hyperthyroidism. Life Sci. 2006;79(3):311-5.

66. Mosawy S1, Jackson DE, Woodman OL, Linden MD.Inhibition of platelet-mediated arterial thrombosis and platelet granule exocytosis by 3',4'-dihydroxyflavonol and quercetin. Platelets. 2013;24(8):594-604.

67. Mukherjee PK, Ahamed KF, Kumar V, Mukherjee K, Houghton PJ.Protective effect of biflavones from Araucaria bidwillii Hook in rat cerebral ischemia/reperfusion induced oxidative stress. Behav Brain Res. 2007;178(2):221-8.

68. Muley MM, Thakare VN, Patil RR, Kshirsagar AD, Naik SR. Silymarin improves the behavioural, biochemical and histoarchitecture alterations in focal ischemic rats: a comparative evaluation with piracetam and protocatachuic acid. Pharmacol Biochem Behav. 2012;102(2):286-93.

69. Nandave M, Ojha SK, Arya DS. Protective role of flavonoids in cardiovascular diseases. Natural Product Radiance. 2005;4: 166-76.

70. Nawar, W.W. Lipids. In “Food Chemistry”, O.R. Fennema 1996; 225-319.

71. Niki E. Antioxidant in relation to lipid peroxidation. Chem Phy. 1987;44:227-53.

72. Ono T, Tsuruta R, Fujita M, Aki HS, Kutsuna S, Kawamura Y, Wakatsuki J, Aoki T, Kobayashi C, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T.Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. Brain Res. 2009;11;1305:158-67.

73. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. Ann Neurol. 1992;32:33-42.

74. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. Am J Physiol. 1988;254:768-74.

75. Pastor M-C, Sierra C, Dolade M, Navarro E, Brandi N, Cabre E, et al. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down's syndrome patients. Clin Chem. 1998;44:924–9.

76. Pathak NN, Balaganur V, Lingaraju MC, Kant V, Latief N, More AS, Kumar D, Kumar D, Tandan SK. Atorvastatin attenuates neuropathic pain in rat neuropathy model by down-regulating oxidative damage at peripheral, spinal and supraspinal levels. Neurochem Int. 2014;68:1-9.

77. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. Anal. Biochem. 1990;16:259-264.

78. Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim J, Quon MJ, Montagnani M. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity reduces blood pressure and protects against myocardial I/R injury in SHR. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2007;292:1378-87.

79. Pradeep H, Diya JB, Shashikumar S, Rajanikant GK. Oxidative stres assassin behind the ischemic stroke. Folia Neuropathol. 2012;50(3):219-30.

80. Pulsinelli W, Buchan AM. The four-vessel oclusion rat model. Method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. Stroke. 1988;19:913-4.

81. Pütün EA. Centaurea thracica (Janka) Hayek ve Centaurea Pichleri Boiss. Subsp Pichleri Flavonoidleri. Eskişehir Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi. 1987.

82. Reffelmann T, Kloner RA. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. Basic Res Cardiol. 2006;101(5):359-72.

83. 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.

84. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. FASEB J. 1995;9:26-33.

85. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents. Pharmacol Ther. 1988;37:231-49.

86. Saleem S, Ahmad M, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, Ishrat T, Islam F. Effect of Saffron (Crocus sativus) on neurobehavioral and neurochemical changes in cerebral ischemia in rats. J Med Food. 2006;9(2):246-53.

87. Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, Inzitari D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. J Neurol Sci. 2002;203-204:263-6.

88. Selvaraj P, Pugalendi KV. Hesperidin, a flavanone glycoside, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. Redox Rep. 2010;15(5):217-23.

89. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. Circ Res. 2000;86:117-118.

90. 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.

91. Shao A, Guo S, Tu S, Ammar AB, Tang J, Hong Y, Wu H, Zhang J. Astragaloside IV alleviates early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. Int J Med Sci. 2014;11(10):1073-81.

92. Shi GF, Wang GY, Chen XF. Screening of radical-scavenging natural neuroprotective antioxidants from Swertia chirayita. Acta Biol Hung. 2013;64(3):267-78.

93. Singh DP, Chopra K. Verapamil augments the neuroprotectant action of berberine in rat model of transient global cerebral ischemia. Eur J Pharmacol. 2013;720(1-3):98-106.

94. Sizlan A, Guven A, Uysal B, Yanarates O, Atim A, Oztas E, Cosar A, Korkmaz A. Proanthocyanidin protects intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusion injury. World J Surg. 2009;33(7):1384-91.

95. Slegtenhorst BR, Dor FJ, Rodriguez H, Voskuil FJ, Tullius SG. Ischemia/reperfusion Injury and its Consequences on Immunity and Inflammation. Curr Transplant Rep. 2014;1(3):147-54.

96. Small DL, Buchan AM. Animal models. Br Med Bull. 2000;56(2):307-17.

97. Sobey CG, Woodman OL. Myocardial ischaemia: what happens to the coronary arteries? Trends Pharmacol Sci. 1993;14(12):448-53.

98. Stavric B. Role of chemopreventers in human diet. Clin Biochem. 1994;27(5):319-332.

99. Stuehr DJ. Enzymes of the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway. The Journal Of Nutrition. 2004; 134:2748S–51S.

100. Sun YX, Tang Y, Wu AL, Liu T, Dai XL, Zheng QS, Wang ZB.Neuroprotective effect of liquiritin against focal cerebral ischemia/reperfusion in mice via its antioxidant and antiapoptosis properties. J Asian Nat Prod Res. 2010;12(12):1051-60.

101. Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K,Elhan A. Sıcanlarda intestinaliskemi modelinde proflaktik kısa ve uzun sureli yuksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. Klinik ve Deneysel Cerrahi. 2000;8:1:10-16.

102. Uchiyama M, Miharama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem; 1978 May; 86 (1): 271-278.

103. Ujita S, Mizunuma M, Matsuki N, Ikegaya Y. Asynchronously enhanced spiking activity of ischemic neuronal networks. Biol Pharm Bull. 2011;34(5):764-7.

104. Undén J, Sjölund C, Länsberg JK, Wieloch T, Ruscher K, Romner B. Post-ischemic continuous infusion of erythropoeitin enhances recovery of lost memory function after global cerebral ischemia in the rat. BMC Neurosci. 2013;12:14-27.

105. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39:44–84.

106. Van den Heuvel MGW, Buurman WA, Bast A. Review: ischemia-reperfusion injury in flap surgery. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2009;62:721.

107. Virág L, Szabó C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacol Rev. 2002;54:375-429.

108. Wang CZ, Mehendale SR, Calway T, Yuan CS. Botanical flavonoids on coronary heart disease. Am J Chin Med. 2011;39(4):661-71.

109. Wang KW, Wang HK, Chen HJ, Liliang PC, Liang CL, Tsai YD, Cho CL, Lu K. Simvastatin combined with antioxidant attenuates the cerebral vascular endothelial inflammatoryresponse in a rat traumatic brain injury. Biomed Res Int. 2014;2014:910260.

110. Wang S1, Thomas CJ, Dusting GJ, Woodman OL, May CN. 3',4'-Dihydroxyflavonol improves post-ischaemic coronary endothelial function following 7days reperfusion in sheep. Eur J Pharmacol. 2009;624(1-3):31-7.

111. Wolfgang Walz. Cerebral ischemia, molecular and cellular pathophysiology. Humana Press Inc. Totova, New Jersey. 1999.

112. Woodman OL, Chan ECh. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2004;31(11):786-90.

113. Xu JX, Yang M, Deng KJ, Zhou H.Antioxidant activities of Dracocephalum tanguticum maxim extract and its up-regulation on the expression of neurotrophic factors in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. Am J Chin Med. 2011;39(1):65-81.

114. Xu M, Chen X, Gu Y, Peng T, Yang D, Chang RC, So KF, Liu K, Shen J. Baicalin can scavenge peroxynitrite and ameliorate endogenous peroxynitrite-mediated neurotoxicity in cerebral ischemia-reperfusion injury. J Ethnopharmacol. 2013;150(1):116-24.

115. Yaidikar L, Byna B, Thakur SR. Neuroprotective Effect of Punicalagin against Cerebral Ischemia Reperfusion-induced Oxidative Brain Injury in Rats. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2014; 23(10):2869-78.

116. Yamamoto M, Shima T, Uozomi T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of α-tocopherol administration. Stroke. 1983;14:977-82.

117. Yuan HJ, Zhu XH, Luo Q, Wu YN, Kang Y, Jiao JJ, Gao WZ, Liu YX, Lou JS. Noninvasive delayed limb ischemic preconditioning in rats increases antioxidant activities in cerebral tissue during severe ischemia-reperfusion injury. J Surg Res. 2012;174(1):176-83.

118. http://www.vucutelektrigi.com/06.html

119. http://www.delinetciler.org/vucudumuzu-taniyalim/158723-beynin-yapisi-ve-anatomisi.html

## 10. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Alanya'da doğdu. İlköğretimi Hayate Hanım İlköğretim Okulunda, lise eğitimini de Özel Ufuk Lisesinde tamamladı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi, 2011 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.