

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULAN
RATLARDA PİKROZİD II 'NİN MİYOKARD İSKEMİ
REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. YÜCEL POLAT**

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. DİLEK ERER**

**ANKARA
2015**

ONAY SAYFASI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	YÜCEL POLAT
Baba Adı	KOTAN
Doğum Yeri/Tarihi	İSTANBUL / 08.03.1982
Diploma Tarihi / Diploma No	24.07.2007 / 3233
Mezun Olduğu Fakülte	TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı/Bilim Dalı	KALP VE DAMAR CERRAHİSİ
İhtisas Süresi	Yıl:5 Ay:
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULAN
RATLARDA PİKROZİD II ' NİN MİYOKARD İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI
ÜZERİNE ETKİSİ

JÜRİ KARARI: Adı geçen Araştırma Görevlisi tarafından hazırlanan ve 15.06.2015
tarihinde teslim edilen tez; aşağıda adı yazılan tez değerlendirme jüri üyeleri
tarafından " uzmanlık tezi " olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

ÜYE


Prof. Dr. Mustafa SİRLAR
Dip. No: 1105
Kalp Damar Cer. A.B.D.
A.U.T.F.

BAŞKAN


Doç. Dr. Dilek ERER
T.C. Gazi Üniversitesi
Gazi Hastanesi
Kalp ve Damar Cerrahisi A.D.
Dip. No: 406 - Dip. Tes. No: 54495

ÜYE


Doç. Dr. Mustafa Hakan ZOR
T.C. Gazi Üniversitesi
Kalp Damar Cerrahisi
Dip. No: 2512 - Dip. Tes. No: 106027

TEŞEKKÜR

Kalp ve Damar Cerrahisi eğitimimde her türlü desteğini esirgemeyen çok kıymetli hocalarım; Prof. Dr. Ali YENER, Prof. Dr. M. Emin ÖZDOĞAN, Prof. Dr. Levent GÖKGÖZ, Prof. Dr. Velit HALİT, Prof. Dr. Halim SONCUL, Prof. Dr. Volkan SİNCİ, Prof. Dr. Erkan İRİZ, Doç. Dr. Tolga TATAR, Doç. Dr. Mustafa Hakan ZOR, Uzman Dr. Abdullah ÖZER, Doç. Dr. Mustafa ASLAN'a teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca her türlü desteği veren tez hocam Doç. Dr. Dilek ERER'e teşekkür ederim.

Kendisini rahmetle ve şükranla hatırladığım hocam Doç. Dr. Veli Yıldırım İMREN'e çok teşekkür ederim

Büyük bir aile olan Gazi KVC ailesindeki asistan arkadaşlarıma, servis, yoğun bakım ve ameliyathane hemşirelerine, perfüzyonistlere, tüm personele ve şirket çalışanlarına teşekkür ederim.

Kendilerine iyi bir evlat olmaya çalıştığım anne ve babama teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca; bana karşı sınırsız desteği, engin sabır ve anlayışından dolayı biricik eşim Burcu POLAT'a çok TEŞEKKÜR EDERİM.

Yücel POLAT
ANKARA 2015

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Onay Sayfası.....	i
Teşekkür	ii
İçindekiler.....	iii
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Tablolar	vii
Şekiller.....	vii
Resimler.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İskemi	3
2.2. Reperfüzyon	5
2.3. İskemi/ Reperfüzyon Hasarından Korunma Yöntemleri.....	6
2.4. İflamatuar Mediatorler	7
2.4.1. Spesifik Kimyasal Mediatorler.....	7
2.4.2. Kompleman Sistemi	8
2.5. Serbest Radikaller.....	11
2.5.1. Oksijen Radikalleri.....	13
2.5.2. Hücrede Radikal Oluşumu	15
2.5.3. Hücrede Hasar Oluşumu	15
2.5.4. Sitokinler	25
2.6. Total Antioksidan Status/ Seviye (TAS).....	28
2.7. Total Oksidatif Status/ Seviye (TOS).....	29
2.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	29
2.9. Miyokardiyal İskemi/Reperfüzyon (İ/R).....	29
2.10. No-reflow Fenomeni	32
2.11. Miyokardiyal Stunning (sersemleme)	33
2.12. Miyokardiyal Hibernasyon.....	33
2.13. Diyabetes Mellitus (DM).....	34

2.14. Diyabetes Mellitus Komplikasyonları.....	35
2.15. Deneysel Diyabet Modelleri ve Serbest Radikaller	36
2.16. Streptozotosin (STZ)	38
2.17. Pikrozid II.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Araştırmanın Tipi	42
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	42
3.3. Etik Kurul Onayı	42
3.4. Kullanılan Denek Materyali	42
3.5. Denek Grupları ve Uygulama Protokolü.....	43
3.6. Streptozotosin (Stz) ile Diyabetes Mellitus Oluşturulması	44
3.7. Pikrozid II'nin Hazırlanması ve Uygulanması	45
3.8. Cerrahi Yöntem	45
3.9. Dokuların Homojenizasyonu.....	47
3.10. Total Antioksidan Status/ Seviye (TAS) Ölçümü	48
3.11. Total Oksidatif Status/ Seviye (TOS) Ölçümü.....	48
3.12. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	50
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇLAR	59
7. ÖZET.....	60
8. ABSTRACT	61
9. KAYNAKLAR.....	62
10.EKLER	71
10.1. Etik Onay.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	: Adenozintrifosfat
TNF- α	: Tümör Nekrosiz Faktör alfa
ISAM	: İntrasellüler Adezyon Molekülü
IL-1 β	: İnterlökin 1-beta
SOR	: Serbest Oksijen Radikali
I/R	: İskemi/ Reperfüzyon
PNL	: Polimorfonükleerlökosit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
NO	: Nitrik Oksit
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
MI	: Miyokard İnarktüsü
GSSH	: Yükseltgenmiş Glutasyon
MDA	: Malondialdehit
TBA	: Tiyoarbitürik Asit
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
GSH	: Glutasyon
IL-1	: İnterlökin 1
IL-6	: İnterlökin 6
TNF- β	: Tümör Nekrosiz Faktör beta
TAS	: Total Antioksidan Status/ Seviye
ABTS	: Etilbenziazolin Sulfonik Asit
TOS	: Total Oksidatif Status/ Seviye
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
CABG	: Koroner Arter Baypas Cerrahisi
EKG	: Elektrokardiyografi
DM	: Diyabetes Mellitus
DKA	: Diyabetik Ketoasidoz

STZ	: Streptozotosin
TLR	: Toll Benzeri Reseptör
NF-kB	: Nükleer Faktör Kappa B
LAD	: Sol Ön İnen Arter
K	: Kontrol
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz

TABLÖLAR

	Sayfa No
Tablo 1. Oksijen bileşikleri.....	12
Tablo 2. Ratların kalp dokusunda oksidan durum parametreleri	51

ŞEKİLLER

Şekil 1. Reversible ve irreversible zedelenme	4
Şekil 2. Perfüzyon fazı.....	6
Şekil 3. Lökositlerin endotele adhezyonu, agregasyonu ve migrasyonu	10
Şekil 4. Oksijen radikallerinin oksidasyonu	12
Şekil 5. Streptozotosin moleküler formülü.....	39
Şekil 6. Pikrozid II molekül formülü.....	40
Şekil 7. Kalp dokusu TOS verileri.....	50
Şekil 8. Kalp dokusu TAS verileri.....	52

RESİMLER

Resim 1. Picrorhiza kurroa bitkisi	39
Resim 2. Trakeostomi açılması	46
Resim 3. Mekanik ventilatör	46
Resim 4. Miyokardiyal iskemi modeli	47

1. GİRİŞ

İskemik kalp hastalığı, günümüzde tüm dünyada mortalite ve morbidite nedenlerinin başında gelmektedir ve gelişmiş ülkelerde ölüm nedenlerinin yaklaşık yarısı kardiyovasküler sistem hastalıklarına bağlıdır. Kardiyovasküler sistem hastalıkları içinde en sık görülen klinik durum koroner aterosklerotik kalp hastalığıdır. Bu hastalıkta miyokardı besleyen koroner kan akımı klinik ve patolojik belirti verecek kadar azalır.

İskemi, herhangi bir organın beslenmesi için gerekli sunulan kan miktarının azalması veya tamamen kesilmesi sonucu oluşan tablodur. İskemik dokularda enerji anaerobik metabolizma yoluyla sağlanmaya çalışılır ve oluşan metabolitler doku perfüzyonu olmadığından doku içinde birikir. Hipoksi sürdükçe hücre içi asidozis gelişir. Hücre zarındaki Adenozintrifosfat (ATP) bağımlı Sodyum- Potasyum Adenozin Trifosfataz (Na-K ATP'az) pompasındaki yetmezlik sonucu hücre içerisine kalsiyum iyonu (Ca^{++}), sodyum iyonu (Na^{+}) ve beraberinde su (H_2O) girmesi sonucu hücresel geçirgenlik bozulur.

İskemik dokuda kan akımının yeniden sağlanmasına reperfüzyon adı verilir. İskemi sonrasındaki reperfüzyon, inflamatuvar yanıt ile ilişkili intrasellüler adhezyon molekülü (ISAM), interlökin 1-beta (IL-1 β), IL-8, tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) gibi birçok transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Reperfüzyon sonrası kan akımının yeniden sağlanır ise metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler sistemik dolaşım ile tüm vücuda yayılır.⁽¹⁾

İskemik alana oksijenin sunumu sonucu oluşan en önemli toksik madde serbest oksijen radikalleri (SOR)'dir.⁽²⁾ Normal fizyolojik koşullarda, SOR

oluşumu ve koruyucu antioksidan mekanizmaları denge halindedir. Antioksidan savunma sistemleri yetersiz olursa SOR miktarı artar ve şiddetli reperfüzyon hasarı oluşur. İskemi/ reperfüzyona (I/R) bağlı miyokard hasarının patofizyolojik mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Aşırı serbest radikal üretimi, hücre içi Ca^{++} iyon dengesizliği, renin-anjiotensin sistemi (RAS), nötrofil, trombositler ile kompleman sisteminin reperfüzyon hasarında rolü olduğu gösterilmiştir.⁽³⁾ Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve hücre zarı hasarının şiddeti, doku hasarının geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olduğunu belirler.⁽⁴⁾

Uzun süreli I/R sonucunda meydana gelen hücre ölümü, geniş bir infarkt alanı (nekroz) oluşturabilir. Bu nedenle hastanın prognozunu ve ilerideki yaşam kalitesini belirlemesi açısından hayati öneme sahiptir ve akut koroner sendromlarda miyokardiyal nekrozu önlemek acil tedavi hedefleri arasında olmalıdır.⁽⁵⁾

Pikrozid II, $C_{23}H_{28}O_{13}$ moleküler formüllü bir glikozit türevidir. Pikrozid II antioksidan, nöroprotektif, antienflamatuar, gastrointestinal septomlarda kullanılmış olsa da etkinliği henüz kesinleşmemiş olup araştırmalar devam etmektedir.

Bu deneysel çalışmada Streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda sol ön inen koroner (LAD) iskemisi öncesi intraperitoneal olarak uygulanan Pikrozid II'nin miyokardı iskemisi ve reperfüzyon hasarına karşı koruyup korumadığının gösterilmesidir.

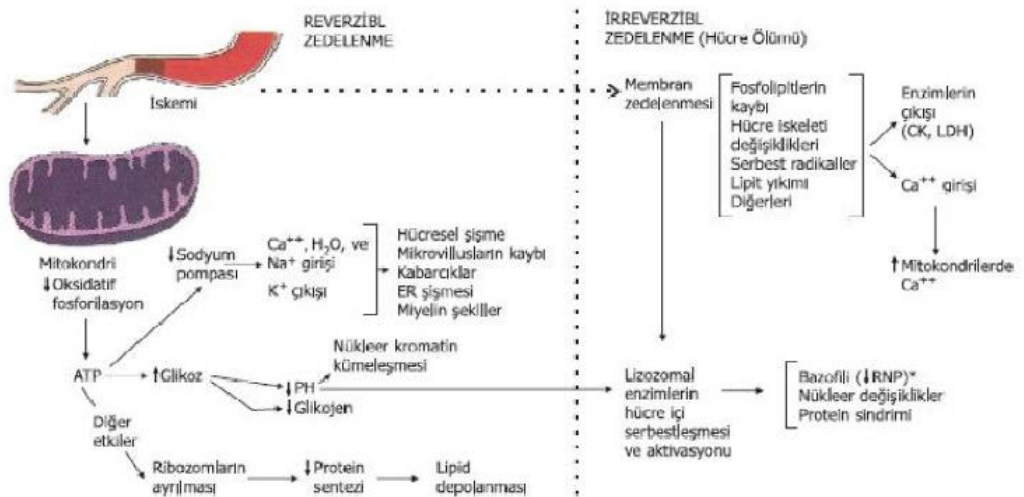
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

İskemi, perfüzyon yetersizliğine bağlı olarak, dokuya gerekli olan oksijen ve diğer metabolitlerin dolaşım tarafından karşılanamaması ve meydana gelen artık ürünlerin yine dolaşım ile buradan uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen ulaşması şeklinde tarif edilebilir. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir.⁽⁶⁾ İskemi ve hipokside aerobik metabolizma devam edemediğinden mitokondrideki oksidatif fosforilasyon engellenir. ATP, kreatinin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır.⁽⁷⁾ Anaerobik glikoliz sonucu oluşan laktik asit ve hasarlanmış lizozomlardan salınan hidrojen (H⁺) iyonu ile hücre içi pH düşer. ATP oluşumu yavaşlar ve durur. ATP azlığı, hücre zarında aktif Na-K ATP'az pompasında yetmezliğe neden olarak hücre içinde Na⁺ tutulmasına ve hücre dışına K⁺ atılmasına neden olur. Solid madde birikimine izo osmotik su birikimi eşlik eder ve hücrel şişme meydana gelir. ATP sentezinin azalması sonucu glikoliz aktivitesinin artmasıyla redüksiyon sistemleri aktive olur. Hücre içi Na⁺ artması sonucu Ca⁺⁺ artar.⁽⁸⁾ Hücre içi Ca⁺⁺'ın artması, fosfolipazlar (fosfolipaz A2), proteazlar (kalpainler) ve endonükleazlar gibi enzimleri aktifleştirir. Fosfolipazenzim aktivitesinin artması ile membran fosfolipidleri parçalanır ve katabolik ürünler birikir. Proteaz enzim aktivitesinin artması ile membran ve hücre iskelet proteinleri parçalanır. Endonükleaz enzim aktivitesinin artması ile nükleer kromatin hasarı meydana gelir. Hücre içi Na⁺ miktarının, fosfolipaz ve proteaz aktivitesinin artması ve ATP

sentezinin azalması sonucu plazma membran permeabilitesi artar. Mitokondri permeabilitesi de artar ve mitokondriyal membran potansiyeli kaybolur. Tüm bu olaylar neticesinde anoksik hasar, nekrotik hücre ölümüne neden olur.⁽²⁾

Kritik iskemi zamanı, doku canlılığının sürdürebildiği maksimum iskemi süresi olarak tarif edilir. Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte uzun süreli iskemide geri dönüşümsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır. Hipoksi sonucunda gelişen mitokondri fonksiyon bozukluğu ve hücre zarı hasarının doku oksijenasyonunun yeniden sağlanmasına rağmen düzeltilememesi geri dönüşümsüz hasarın en önemli göstergesidir.⁽⁹⁾

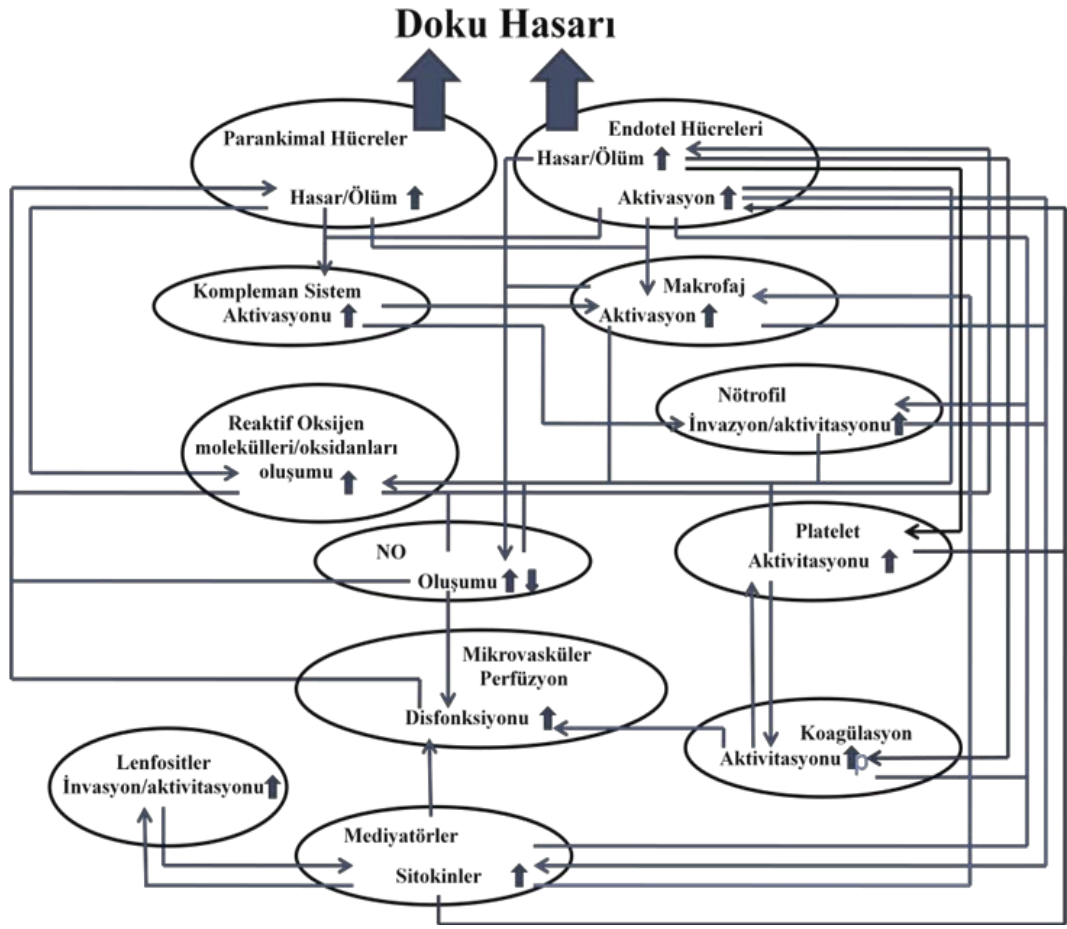


Şekil 1. Reversible ve irreversible zedelenme

2.2. Reperfüzyon

Miyokard veya diğer hücrelerde iskemi sırasında oluşan toksik hasar oksijenin dokulara yeniden verilmesi ile daha da şiddetlenmektedir. Dokuya oksijen sunulması sonucu oluşan bu duruma oksijen paradoksu denir.⁽¹⁰⁾ İskemik dokuda artan oksijen radikalleri, kan akımı düzeldikten sonra reperfüzyon hasarına neden olur. Toksik oksijen türevlerinin büyük ölçüde reperfüzyon sırasında iskemi alanına infiltre olan polimorfonükleer lökosit (PNL) tarafından yapıldığı düşünülmektedir.⁽¹⁰⁾

Reperfüzyonu takiben inflamatuvar yanıt meydana gelir.⁽¹¹⁾ İnflamatuvar yanıtta endotel hücreleri, nötrofiller, makrofajlar, lenfositler ve plateletler aktive olur. Koagülasyon kaskadının aktivasyonu ve mediatörlerin salınımı sonucu mikrovasküler perfüzyon disfonksiyonu oluşur. Reaktif oksijen molekülerinin oluşumu artar.



Şekil 2. Perfüzyon fazı

2.3. İskemi/ Reperfüzyon Hasarından Korunma Yöntemleri.⁽²⁾

1. Kademeli reperfüzyon
2. İskemik önkoşullama (preconditioning)
3. Nötrofillerin temizlenmesi
4. Hipoksik reperfüzyon
5. Antioksidanlar: Süperoksit dismutaz/ Katalaz/ Tioller/ E vitamini

6. İlaçlar ve diğer terapötik etkileşimler: Kalsiyum antagonistleri/ Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü(ACEİ)/ Allopurinol/ Demir şelasyon/ Fosfokeratin/ Lidoflazin

2.4. İflamatuar Mediatörler

Histamin, inflammatuar doku yanıtı oluşmasına aracılık eden kimyasal mediatörlerden ilk keşfedilendir. Mediatörler; hasarlı dokulardan, hücrelerden ve plazmadan köken alan çeşitli kimyasal maddelerdir.

Aktive edilen ve hücreden salınan mediatörlerin çoğu kimyasal bir dizi değişikliğe uğrar veya enzimler tarafından inaktive edilir. Komplemanlar gibi plazmadan köken alan mediatörler biyolojik aktivitelerini kazanmak için bir dizi proteolitik değişiklikler geçirir. Hücreden köken alan mediatörler ise hücre içi granüllerde bulunur ve ihtiyaç halinde salgılanır veya bir uyarıyla yeniden sentezlenir. Kimyasal mediatör hedef hücreyi etkileyerek ikincil mediatör çıkışını uyarabilir. Bu ikincil mediatörler başlangıçtaki mediatörlere benzeyebilir veya aynısı olabilir. Hemen tümü hedef hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanarak aktivasyon gösterir.⁽¹⁰⁾

2.4.1. Spesifik Kimyasal Mediatörler⁽¹⁰⁾

1. Vazoaktif aminler: Histamin, serotonin
2. Plazma proteazları: Kininler (bradikinin, kallikrein), kompleman sistemi, koagülasyon-fibrinolitik sistem (fibrinopeptidler ve fibrin yıkım ürünleri)

3. Aroşidonik asit meatbolitleri: Siklooksijenaz yolu ile prostogalandinler, tromboksanlar, endoperoksitler. Lipoksijenaz yolu ile lökotrienler, hidroperosieikazatetraenoik asid (HPETE), hidroksieikozatetraenoik asit (HETE).

4. Lökosit ürünleri: Lizozomal proteazlar, serbest oksijen radikalleri

5. Trombosit Aktive Eden Faktör (TAF)

6. Sitokinler

7. Büyüme faktörleri

8. Diğer mediatörler

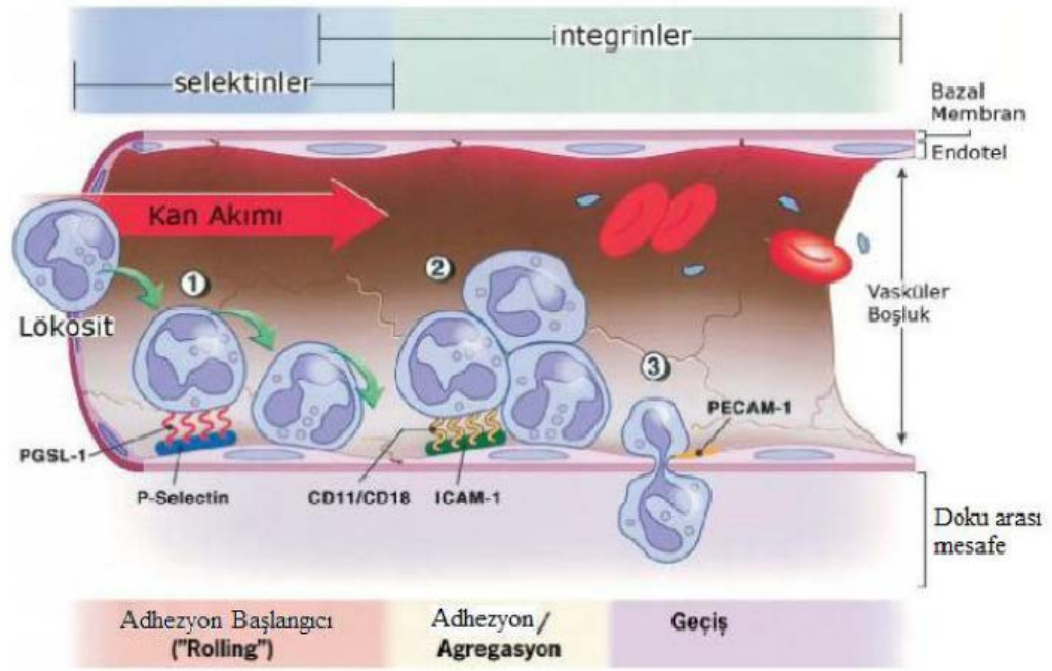
2.4.2. Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi plazmada inaktif olarak bulunan enzimlerin kademeli aktivasyonu ile inflamatuvar peptidlerin, opsoninlerin ve hücre zarı saldırı kompleksinin oluştuğu bir yoldur. Bu yolda oluşan proteinler anaflatoksi, inflamasyon bölgelerinde vazodilatasyon, vasküler permabilitiyi artıran ve fagositlerin endotele yapışmasını uyaran etkiler gösterirler. Kompleman sistemi, bir dizi plazma proteini ve hücre zarı reseptöründen oluşmaktadır. Hepatositler, monositler, makrofajlar, böbreğin tübüler ve glomerüler hücreleri kompleman komponentlerinin sentez yerlerinden bazılarıdır. Kompleman sistemi proteinleri, serum total proteinin %10'unu oluşturur. Beyin omurilik sıvısında ise kompleman düzeyleri çok düşüktür. Aktivasyon sırasında kompleman komponentlerinin çoğu, enzimatik olarak biri daha büyük olmak üzere, iki parçaya ayrılır. Küçük parçası, anaflatoksik, kemotaksik ve vasküler geçirgenliği artırıcı özellikler gösterirken

büyük parçası ise bakteri zarları veya immunkompleks gibi farklı yüzeylere bağlanan ve bir sonraki komponenti aktive eden enzimatik bölgeye sahiptir. ⁽¹¹⁾

Birçok organ sisteminde yapılan çalışmalarda reperfüzyon döneminde kompleman sisteminin lokal aktivasyonuna rastlanmıştır. ^(12,13) Kompleman sisteminin aktivasyonundan sonra proinflamatuvar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a iC3b ve C5b-9' dur. C3a ve C5a anafatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. ⁽¹⁴⁾ Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj inflamatuvar protein MIP-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein MCP-1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyarak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır: ⁽¹⁵⁾ Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1), intersellüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1), E-selektin, P-selektin.

Kompleman faktörleri PAF, histamin salınması ve hücre permeabilitesinin artması yoluyla direkt hücre hasarına neden olur. Buna ilave olarak, kompleman faktörleri, özellikle C5a, süperoksit üretimi ve nötrofil adheransının güçlü uyarıcılarıdır.



Şekil 3. Lökositlerin endotele adhezyonu, agregasyonu ve migrasyonu

Kompleman reseptörleri; eritrosit, monosit, makrofaj, nötrofil, B ve T lenfosit, eozinofil, düz kas, epitelyum ve Langerhans gibi birçok hücre üzerinde bulunmaktadır. Kompleks metabolik donanımları olan bazı hücreler ise, kompleman komplekslerini içlerine alarak etkisiz hale getirdikten sonra veziküller halinde hücre zarından atarak kendilerini savunabilmektedir. Normal fizyolojik şartlarda komplemanların aktivasyonu bazı düzenleyici proteinlerce (C1 inhibitör, C4 bağlayıcı protein, Faktör H ve I) kontrol edilir.

Deneyisel oluşturulan miyokardial iskemide C1 esteraz inhibitörünün reperfüzyondan önce uygulanmasıyla C1q depozisyonunun önlendiği ve miyokardial nekrozda azalma olduğu gösterilmiştir. Gerçekten de bugün kompleman antagonistleri ve antioksidanlar benzer deneysel çalışmalarda kullanıldığında kompleman antagonistlerinin iskemi reperfüzyon hasarını

azaltmada daha etkin olduğu ve dolayısıyla altta yatan mekanizmanın daha çok kompleman sistemine bağılı olduğunu düşündürmektedir.⁽¹⁶⁾

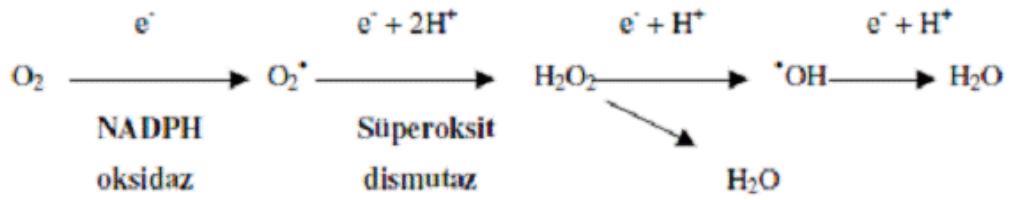
2.5. Serbest Radikaller

Serbest radikal, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunan bir atom veya moleküldür. Dış orbitalde iki ile bölünmeyen elektron varlığı, atom veya molekülü reaktif kılar. Bunlar stabil olmadığından çok kısa ömürlüdür.⁽¹⁷⁾ Fakat yapılarındaki dengesizlik nedeniyle diğer moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişi yaparak onların kararlı yapılarını bozarlar.⁽¹⁸⁾ Elektriksel yükleri pozitif, negatif veya nötr olabilir. Reaksiyona girme olasılıkları, elektriksel yüklerine bağlıdır.⁽¹⁸⁾ Tüm hücre bileşenleri ile etkileşerek kimyasal yapılarında değişiklik oluştururlar. Böylelikle metabolik ve yapısal değişikliklere neden olurlar ve hatta hücre ölümüne de yol açabilirler. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı arasındaki denge devam ettiği sürece organizma bu maddelerden etkilenmemektedir.^(19,20)

Normal sağlıklı koşullarda, SOR oluşumu ve koruyucu antioksidan mekanizmaların oluşan SOR'u organizmadan temizlemesi denge halindedir.

İskemi/ Reperfüzyon hasarından serbest oksijen radikalleri önemli rol oynamaktadır. Canlı organizmalarda aerobik ortamda serbest radikallerin en önemli kaynağının moleküler oksijen olduğu kabul edilmektedir. Aerobik canlılarda ortamda sürekli oksijen bulunduğu için serbest radikaller daha sıklıkla oksijen radikali biçimindedir.^(4,21) Diğer serbest radikal kaynakları olarak NO, endoplazmik retikulum, aktive nötrofiller, mitokondrial elektron

transport sistemi, peroksizom ve plazma membranıdır. Aerobik şartlarda normal metabolizma sırasında oksijen (O₂)'nin %98'i su (H₂O)'ya indirgenmektedir. Geriye kalan %2'lik kısım ise süperoksit (O₂•) ve hidroksil (•OH) radikaline dönüşür. Radikallerle eşlenmemiş elektron nokta ile gösterilmektedir.⁽²⁾



Şekil 4. Oksijen radikallerinin oksidasyonu

Serbest radikaller üç şekilde meydana gelir;⁽²⁾ hemolitik ayrılma, normal bir moleküle elektron eklenmesi ve normal bir molekülden elektron kaybıdır.

Tablo 1. Oksijen bileşikleri⁽²⁾

Reaktif Oksijen Bileşikleri	Reaktif Olmayanlar
O ₂ ⁻ : Süperoksit	H ₂ O ₂ : Hidrojen Peroksit
OH ⁻ : Hidroksil	O ₂ : Singlet Oksijen
HO ⁻ : Hidroperoksil	HOCl : Hipokloröz Asit
RO ⁻ : Alkoksil	ONOO ⁻ : Peroksinitrit Radikali
ROO ⁻ : Peroksil	O ₃ : Ozon
NO ⁻ : Nitrik Oksit	LOOH : Lipid Hidroperoksit
NO ⁻ : Azot Dioksit	

Serbest radikal reaktanlarının radikal olmayan ürünler oluşturmasına dismutasyon reaksiyonu denir. Bu reaksiyonlar spontan olabildiği gibi süperoksit dismutaz enzimi tarafından da katalizlenebilir.

2.5.1. Oksijen Radikalleri

1. Süperoksit ($O_2\bullet$) Radikali:

Oksijen molekülüne bir elektronun ilavesiyle oluşur. Serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile H_2O_2 'e indirgenir. Süperoksit çok toksik olmayan bir serbest radikaldir. Diğer oksijen bileşiklerinin oluşumunda anahtar rol oynar. Zayıf oksidan etkisine karşın düşük pH değerlerinde protonlanarak daha reaktif olan hidroperoksid radikalini oluşturur.

2. Hidroperoksit (HO_2) Radikali:

Hidroperoksit biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleri ile direkt etkileşime girebilmesi yönünden önemlidir. Süperoksitten daha reaktiftir.

3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2):

Oksijenin, 2 e^- ve 2 H^+ ile reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Biyolojik sistemlerde ise süperoksit oluşumu yoluyla sıklıkla meydana

gelmektedir. Burada iki süperoksit molekülü iki hidrojenle reaksiyona girerek H_2O_2 ve O_2 oluşur.

Hidrojen peroksit serbest radikal olmamakla birlikte serbest oksijen radikalleri içinde sayılan ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynayan bir üründür. Metal iyonlarının yokluğunda stabil, zayıf oksidan, zayıf redüktan, biyolojik membranları kolayca geçebilen ve uzun ömürlü bir oksijen bileşiğidir. Metal iyonlarının varlığında ise kolaylıkla parçalanır ve OH radikali oluşumuna neden olur. Bu reaksiyona Fenton reaksiyonu denir. Süperoksit radikalının varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidroksil radikali oluşturur.⁽²²⁾

4. Hidroksil ($\bullet OH$) Radikali:

En reaktif ve kısa ömürlü olan radikaldir. Hücrede oluştuğu yerden daha uzağa gidemez ve hemen çevre dokularda oldukça büyük hasara yol açar.

5. Nitrik oksit ($NO\bullet$) Radikali:

NO molekül ağırlığı düşük, gaz tabiatında oldukça reaktif bir moleküldür. Yağda çözünür ve biyolojik membranlardan kolaylıkla geçer. Yarılanma ömrü çok kısa (3-5 saniye) olduğundan nitrit veya nitrata hızla okside olur. Bunlar $NO\bullet$ radikalının stabil son ürünleridir.

Nitrik oksit endotel hücresi, sinir hücresi, düz kas hücresi, makrofaj ve trombosit gibi çeşitli hücrelerde sentezlenir. Bu hücrelerde nitrik oksit

sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-Arginin'den sentezlenir. Sonuçta L-Sitrülin ve NO oluşur.

NO kardioprotektif önemli bir moleküldür. Ancak bu etkisi doza bağlıdır. Düşük dozda faydalı olduğu görünürken, yüksek dozda zararlıdır.

Normalde, NO'nun küçük miktarı endotelial NOS tarafından üretilir ve vasküler tonusu regüle eder. İskemi reperfüzyon hasarında NO sentezi artar ve NO'nun toksik etkileri ortaya çıkar. Kısaca iskemi reperfüzyon hasarında önemli bir role sahiptir.⁽²³⁾

2.5.2. Hücrede Radikal Oluşumu

Normal durumlarda hücrelerdeki serbest radikalın majör kaynağı elektron transport zincirinden olan elektron kaçaklarıdır. Endoplazmik retikulum ve mitokondrilerde moleküler oksijen ve süperoksit oluşur. Süperoksit veya hidrojen peroksit oluşumunda peroksizomlarda lokalize flavin oksidaz gibi enzimler rol oynar.⁽²⁴⁾ Mitokondriyal radikallerin kaynağı, mitokondri iç membranında yer alan elektron transport zinciridir. Oksijenin %95'i herhangi bir ara metabolit oluşmadan H₂O'ya indirgenirken, kalan %5'i serbest radikal oluşturur.⁽²⁵⁾

2.5.3. Hücrede Hasar Oluşumu

Reperfüzyon döneminde oluşan serbest radikallere bağlı olarak, hücrenin temel yapı ve fonksiyonlarında değişik derecelerde hasar oluşmaktadır. Bu hasara en fazla duyarlı olan yapılar membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit (DNA) molekülleridir.⁽²⁶⁾

Hasar meydana gelmeye başlayınca hücrede membran potansiyelleri bozulmakta enzim fonksiyonlarında azalma olmakta ve geçirgenlik artarak hücre bütünlüğünün bozulmasına kadar gitmektedir.

Serbest radikallerin diğer hedefi hücrenin protein yapılarıdır. Amino asitlerden bazıları oksidasyona daha fazla maruz kalabilmektedir, terminal sülfidril grubu bulunduran (metionin, sistein) amino asitlerle aromatik amino asitlerdir. (tirozin, histidin, fenilalanin) Serbest radikallerin DNA üzerine etkileri pürin ve pirimidin bazlarına olan etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller DNA' nın yapı taşı olan nükleik asitlerden özellikle guanidin bazını etkileyerek hücrede yapısal bozukluk oluşturmakta ve mutasyonlar meydana gelmektedir. ⁽²⁷⁾

Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar. ⁽²⁸⁾

2.5.3.1. Makromoleküllerdeki Hasarlanma Mekanizmaları

1. Lipid peroksidasyonu
2. Protein oksidasyonu
3. DNA
4. Kovalen bağlanma

5. Kalsiyum

1. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır.⁽²⁹⁾ Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın etkisiyle membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit ile hidroksil radikalının olduğu kabul edilmektedir. Yağ asidi zincirinden, bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal niteliğini kazanır. Bunun sonucunda oluşan radikal, alkil radikali olup dayanıksız bir türevidir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılması ve lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda lipid peroksi radikali (LOO) oluşur.

Lipid peroksi radikali zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek hidrojen preoksit ve yeni bir alkil radikali oluşturur. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikleriyle etkileşmesi sonucu etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşür. ^(10,29) Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücrenin hasarına ve içeriğinin serbestleşmesine neden olur.

2. Protein Oksidasyonu

Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metioninsulfokside, histidinoksihistidine veya asparagine, tirozinditirozine ve sisteindisulfitlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir.^(28,29)

3. DNA

Serbest oksijen radikalleri adenin ve piridin nükleotid oluşumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olur.⁽³⁰⁾

4. Kovalen Bağlanma

Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve nitroz aminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalan bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir.⁽³⁰⁾

5. Kalsiyum

Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünölen bir elementtir. Kalsiyumun transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Ca^{++} -ATP'az enzimleri önemli sulfidril gruplarına sahiptir ve serbest SOR tarafından inaktive edilebilir. Sitokinler, hipoksi, endotoksin gibi faktörler, SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler.⁽³¹⁾

2.5.3.2. Reperfüzyon hasarının parametreleri⁽²⁾

1. İndirgenmiş glutatyon (GSH) / Yükseltgenmiş glutatyon (GSSH) oranı
2. Süperoksit dismutaz
3. Katalaz
4. Malondialdehit
5. Hidroperoksidazlar
6. Tiyobarbitürik asit
7. İsoprostanlar

1. GSH/GSSH Oranı

İndirgenmiş glutatyon (GSH) / yükseltgenmiş glutatyon (GSSH) oranı oksidatif stres gelişiminin ve serbest radikal oluşumunun bir göstergesidir. Glutatyon homeostazisinin sürdürülmesi, oksidatif strese karşı majör savunma mekanizmalarından biridir.^(4,25,32,33) GSH, süperoksit radikallerin ortadan kaldırılmasında GSH-Px enziminin etkisi için substrat olarak kullanılmaktadır. Ca⁺⁺ bağımlı ATP'az ve glikolitik enzimlerin disülfid tiyollerinin hücre içi düzenleyicisi olarak etki etmektedir.

2. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Esas endojen antioksidandır. Oksijen üreten tüm mikroorganizmalarda bulunan metalloproteindir. Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi artar. Substratı olan süperoksitin moleküler oksijene dönüşümünü sağlar.⁽²⁾

İnsanlarda SOD'ın üç tipi vardır:

SOD-1: Cu-Zn SOD: Sitoplazmada bulunur.

SOD-2: Mn-SOD: Mitokondride bulunur ve antitümör aktivitede etkindir.

SOD-3: ES-SOD: Ekstrasellüler sıvıda bulunur. Heparin ve heparin sülfat gibi glukozaminoglikanlara afinitesi yüksektir. Memeli dokularında regülasyonu primer olarak sitokinlerce sağlanır.⁽³⁴⁾ SOD hücredeki SOR toksisitesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Hücrelerdeki SOD ve GSH-Px aktivitesi arasındaki dengesizlik hücrelerdeki oksidatif stresin bir belirteci olarak kabul edilir. GSH-Px aynı zamanda GSH'ın yükseltgenmesinde etki etmektedir.^(32,33,35,36) SOD, fagosit edilmiş bakterilerin hücre içinde öldürülmesinde de görev alır. Hücreyi özellikle DNA'yı radyasyonun iyonizan etkisine karşı koruyucudur.⁽³⁷⁾

3. Katalaz

Bütün memeli hücrelerinde genellikle kan, kemik iliği, subsellüler organellerinin iç kısmında bulunan peroksizom enzimidir. Aktif merkezinde dört adet hem grubu içeren tetramerik yapılı bir hemoproteindir. Dokuların H₂O₂ molekülünü su ve oksijene metabolize ederek reperfüzyon hasarından korur. H₂O₂ aktivitesinin azaltılmasında GSH-Px'a göre daha düşük aktivitelidir. H₂O₂ oluşumunu, lipid peroksidasyonu ve vasküler hasarı baskılar.^(7,38,39)

4. Malondialdehit

Serbest radikallerin en önemli hasarlarından biri lipid peroksidasyonudur ve bu MDA oluşumu ile değerlendirilebilir.^(25,32,40,41) Lipid peroksidasyon yan üründür. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelir ve ölçümü tiyobarbitürik asitle yapılmaktadır. Günümüzde birçok hastalıkta oksidatif stres belirteci ve doku hasarının iyi bir göstergesidir.^(20,42) İ/R hasarının şiddetini değerlendirmede yaygın kullanılan geleneksel yöntemlerden biridir, ancak duyarlılığı ve özgünlüğü düşüktür.⁽⁴³⁾ Hücre membranları yağ asitleri ve fosfolipidlerden oluşmaktadır. Serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonuna yol açarak fonksiyonel ve yapısal değişikliklere neden olabilir. Lipidperoksit, hücre membranlarında rüptür, iyon kanallarında ve pompalarda değişikliğe neden olur. İntrasellüler Ca^{++} konsantrasyonundaki artış, Ca^{++} bağımlı fosfolipaz, proteaz ve endonükleaz gibi bazı enzimlerin aktivasyonuna neden olmaktadır.

5. Hidroperoksidazlar

Memeli dokularının hasarı, doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Esteraz ve lipoksijenaz enzimlerinin aktivasyonu hidroperoksidazları oluşturur.^(36,43,44) Oksidasyon reaksiyonlarında ilk olarak lipid peroksil radikalleri oluşur. Daha sonra lipid hidroperoksitler meydana gelir. Fulminan hepatit, MI ve şiddetli yanık lipid peroksit miktarını artırır. Antioksidanlarla tedavi ile lipid peroksidasyon işlemlerinin azaltılabileceği

kabul edilmektedir. Çeşitli dokular içinde GSH ve GSSH transportu olduğundan kan glutatyon seviyesinin ölçülmesi pratikte yapılabilmektedir.

6. Tiyoarbitürik Asit (TBA)

Lipid peroksidasyon aldehytleri (MDA gibi) ile reaksiyona giren ve biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için sık kullanılan parametrelerden biridir. Plazmadaki TBA ölçümü, hastalıklarda oksidatif stresi ve radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunu araştırmak için kullanılmaktadır. ^(25,33,40)

7. İsooprostanlar

Serbest radikallerin katalizlediği bir mekanizma ile araşidonik asitten oluşan ürünlerin oluşturduğu bir kompleks ailedir. İnsanda ilk defa 1990 yılında Morrow ve ark. tarafından araşidonik asidin serbest radikaller tarafından peroksidasyonu sonucu oluşan prostoglandin F2 benzeri bir ürün olarak saptandığından F2 isoprostanlar olarak adlandırılmışlardır.⁽⁴⁵⁾ İdrar, plazma, BOS, seminal sıvı ve perikard sıvısında ölçülmüştür. Serbest radikal hasarının olduğu bölgede salındığı, daha sonra dolaşımda dilüe olduğu ve bu nedenle bölgesel vazokonstrüksiyonda etkili olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal mekanizması sonucu araşidonik asitten oluşan kompleks bir ailedir. Vasküler hastalıklarda lipid peroksidasyonunu araştırmak için fırsat sağlayan patofizyolojik biyomarkerlerdir. Endojen antioksidanlar, organizmada normal metabolik olaylar sırasında sürekli olarak oluşan serbest radikalleri etkisizleştirir. Oksidan maddeler

belirli düzeyin üzerine çıktığında ve antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında serbest radikaller lipid, protein, karbonhidrat ve nükleik asit gibi hücrenin bazal yapı taşlarını hasara uğratar. ^(4,46,47)

2.5.3.3. Radikallere Karşı Savunma Mekanizmaları

Memeli hücrelerini oksidanlara karşı savunan beş mekanizma önemlidir.^(24,32) Metal iyonlarının bağlanması ile toksik radikal oluşumunun önlenmesi, oluşan radikallerin toplanması ve bastırılması, radikal zincir reaksiyonlarının kırılması, hedef molekülün hasar sonrası tamiri veya tamir edilemeyecek durumdaki moleküllerin uzaklaştırılması, antioksidan kapasitenin artırılmasıdır.

Antioksidanlar ikiye ayrılır ;⁽²⁾

1. Enzimatik Antioksidanlar: Süperoksit dismutaz(SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz
2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar: C vitamini, E vitamini, melatonin, bazı β -blokerler (metoprolol,karvedilol), amiodaron, karotenoidler, tiyol antioksidanlar (glutatyon, tiyoredoksin velipoik asit), naturel flavanoidler

1. Gluatyon Peroksidaz

Hücrelerin daha çok sitozollerinde bulunur. Membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif hasara karşı korur. İnsanlarda dört farklı GSH-Px bulunur ve bunların hepsi peroksitlere iki elektron ekleyerek selenoller (Se- OH)

oluştururlar. Seleno enzimler, antioksidan özellikleri sayesinde peroksitleri Fenton reaksiyonu aracılığıyla elimine ederler. GSH-Px'in aracılık ettiği katalitik reaksiyonun substratları, H_2O_2 ve organik peroksit $ROOH$ 'dır.⁽³⁶⁾

GSH-Px, fagositik hücrelerde önemli görevlere sahiptir. Eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkin antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma H_2O_2 'nin artmasına ve şiddetli hücre hasarına neden olur.⁽⁴⁸⁾

2. Glutasyon

Tiyol grubu antioksidanlardan biridir. Tripeptit yapıda olup sitozol, çekirdek ve mitokondride yüksek oranda bulunur. Glutasyonun redükte formu GSH (glutasyon); okside formu GSSH (glutasyon disulfid)'dir. GSH çekirdekte DNA yapımı ve onarımı için gerekli olan sülfhidril proteinlerinin redükte durumunun sürdürülmesinde görev alır.⁽³⁶⁾

3. C Vitamini (Askorbikasıit)

Akciğer, göz gibi vücudun aköz sıvılarında bulunur .E vitamini ve karotenoidlerle birlikte çalışır. Membranlarda ve lipoproteinlerde oluşan α -tokoferol radikalini yeniden α -tokoferol formuna dönüştürür.⁽²⁾

4. E Vitamini

Yağda eriyebilir. İnsanlardaki enaktif formu olan α -tokoferol, hücre membranına bağlı bulunur ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterir. Antioksidan reaksiyon sırasında α -tokoferol, bir labil hidrojeni lipid veya lipid

peroksil radikaline vererek kendisi α -tokoferol radikaline dönüşür. Oluşan bu ürün ise C vitamini tarafından tekrar α - tokoferole geri çevrilir.⁽²⁾

2.5.4. Sitokinler

Spesifik reseptörlerine bağlanarak inflamatuvar ve immünolojik yanıtta görevli düzenleyici proteinlerdir. Endotel hücreleri, lökositler ve hemen hemen tüm çekirdekli hücreler tarafından sentezlenirler.⁽⁴²⁾ İ/R hasarında inflamatuvar cevabın hem başlatılmasında hem de devamında önemli role sahiptirler. Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinler gözlenir. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1'in hemde TNF- α ' nın vasküler yaralanmaya katkıda bulundukları ve endotel adhezyon moleküllerini artırdıkları gözlenmiştir.⁽¹⁰⁾ İ/R'da sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin direkt mi yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir.⁽⁴⁹⁾

1. Tümör Nekrosiz Faktör (TNF)

Tümörlerde hemorajik nekroz yaptığı için bu isim verilmiştir. Kaşektin olarak da bilinir. TNF- α ve TNF- β olarak ikiye ayrılır. TNF- α ve TNF- β arasında yaklaşık %30 oranında benzerlik vardır. 6. Kromozom üzerinde yer alan iki ayrı gen tarafından yapılır. Aynı hücre yüzey reseptörüne bağlanmak için yarışır. TNF- α 'nın molekül ağırlığı 17 kDa'dır. TNF- α başlıca aktif makrofajlar tarafından yapılır. TNF'nin iki ayrı gen tarafından kodlanan iki ayrı reseptörü

vardır. TipII reseptör başlıca miyeloid hücrelerde bulunurken TipI reseptör pek çok hücrede mevcuttur.⁽⁵⁰⁾ TNF- α 'nın biyolojik fonksiyonları, konsantrasyonuna bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda etkisi lokaldır. Lökositler ve endotel hücreleri üzerine otokrin ve parakrin etki yapar.

TNF- α , damar endotelinde bazı adezyon moleküllerinin ortaya çıkmasına yol açar. Adezyon molekülleri endotelin önce nötrofiller daha sonra da mononükleer lökositler için yapışkan olmasını sağlar. Böylece inflamatuvar reaksiyondan sorumlu hücreler infeksiyon sahasına toplanır. TNF- α , nötrofil, eozinofil ve mononükleer fagositlerin mikroorganizmaları öldürmesini aktive eder, mononükleer fagositler ve diğer bazı hücrelerin inflamatuvar yanıtta önemli rolleri olan IL-1, IL-6, TNF- α ve kemokin gibi sitokinlerin üretimini uyarır.⁽⁵⁰⁾

2. İnterlökinler

Mononükleer fagositler, B lenfositler, Naturel Killer (NK) hücreler, hücre kültürlerinde büyüyen T lenfositler, Keratinositler, dentritik hücreler, astrositler, fibroblastlar, nötrofiller, endotel ve düz kas hücreleri tarafından yapılabilse de başlıca kaynağı aktif mononükleer fagositlerdir.⁽⁵⁰⁾ IL-1ailesi; IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra ve IL-1 γ olmak üzere dört alt gruptan oluşur.^(51,52)

IL-1, düşük konsantrasyonda lokal inflamasyon mediatörü olarak etki gösterir. Endotel hücrelerin prokoagülan özelliklerini ve lökosit adezyonunu mümkün kılan yüzey moleküllerinin ekspresyonunu arttırır. Mononükleer fagosit ve endotel hücrelerde kemokin sentezini uyarır. IL-1'in parakrin etkisiyle T lenfositler IL-2 yapar ve yüzeylerinde IL-2 ve IFN- γ reseptörlerinin

ekspresyonu kuvvetlenir, klonal proliferasyon olur. Yardımcı T lenfositler üzerine olan bu etkileriyle IL-1, hümmoral ve hüccresel immün yanıtları kuvvetlendirir, B lenfositlerin büyüme ve çoğalmalarında, immün globülin sentezlenmesinde olumlu etkisi vardır. Koloni uyarıcı faktörlerle sinerjistik çalışarak kemik iliğindeki progenitör hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmalarını uyarır. Kemik iliğinde nötrofil yapımını ve salınımını artırır. Eitel hücrelerinin proliferasyonu ve fonksiyonlarını uyarır. Pankreasın beta hücrelerini etkileyerek plazma insülin düzeylerinde değışikliğe yol açar. İnvitro pek çok tümör hücresi üzerine sitostatik ya da sitotoksik etki gösterebilir.⁽⁵⁰⁾

Inflamatuar reaksiyon sırasında, lökosit ve nötrofiller iskemi bölgesine hızla hareket etmektedir. Lokositler kapillerlerde obstruksiyon, vazokonstriksiyon ve sitotoksik mediatörlerin salınımı sonucu hücrelerde irreversible değışikliklere neden olmaktadır. IL-1 β nötrofil infiltrasyonunda ve adezyon molekülünün ekspresyonunun artışında rol oynamaktadır.⁽⁵³⁾ Ayrıca, inflamatuar metabolit ve enzimlerden, prostoglandinlerin, kollajenaz ve fosfolipaz A2'nin salınımını arttırmaktadır. TNF- α ve IL-6 sentezinin stimülasyonu yanı sıra her ikisiyle de sinerjistik etki göstermektedir.⁽⁵⁴⁾ IL-1 β 'nin bu etkilerine ilaveten iskemi esnasında intrasellüler kalsiyum düzeyinin artmasında, serbest oksijen radikallerinin oluşumunda, NO sentezi stimülasyonu sonucu NO artışında, araşidonik asit salınımında, CRP, kompleman, β -amiloid düzeylerinin yükselmesinde önemli rolü bulunmaktadır.⁽⁵⁴⁾ Anti IL-1 β antikorları ve IL-1 reseptör antagonistleri kullanılmasının yanı sıra IL-1 β sentezinde görevli enzimlerin inhibisyonunun inflamasyonun ve dolayısıyla iskemik sürecin

düzelmesinde yardımcı olacağı düşünülmektedir.⁽⁵⁵⁾ IL-6 hem lenfoid hemde non-lenfoid hücrelerce üretilir. İnflamasyonda akut faz cevabını düzenler.⁽⁴²⁾ IL-8, güçlü bir kemokindir. İskelet sisteminde, miyokardiyal ve renal İ/R hasarında anlamlı düzeylerde olduğu gösterilmiştir. Lökositlerde ve endotel hücrelerinde sentezlenir. Nötrofil komotaksisi ve adhezyonu fonksiyonunun yanı sıra nötrofillerden salınan proteolitik enzimlerin degranülasyonuna da neden olur. Oksidatif patlamadaki bu rolünden dolayı reaktif oksijen moleküllerinin üretimini arttırmış olur.⁽⁴²⁾

2.6. Total Antioksidan Status/ Seviye (TAS)

Normal sağlıklı koşullarda, SOR oluşumu ve koruyucu antioksidan mekanizmaların oluşan SOR'u organizmadan temizlemesi denge halindedir. Canlı organizmada koruyucu antioksidan sistem; SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimatik veya C vitamini, E vitamini, melatonin gibi enzimatik olmayan moleküllerden oluşur.⁽²⁾

TAS, serbest radikallerin saldırısına karşı organizmadaki total antioksidan korumayı yansıtır.⁽⁵⁶⁾ TAS seviyesinin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgi verir.^(57,58)

TAS seviyesi ölçümü, örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS (Etilbenzotiazolin Sulfonik Asit) katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonu ile orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır.⁽⁵⁸⁾

2.7. Total Oksidatif Status/ Seviye (TOS)

Vücudumuzda mevcut oksidan ve antioksidan dengenin, oksidanlar lehine bozulması sonucu meydana gelen patolojik durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stresin toplam değeri Total Oksidatif Stres (TOS) olarak ifade edilir.⁽⁵⁹⁾ Bu durum, aşırı miktarda reaktif oksijen radikali veya nitrojen radikallerinin oluşumu veya antioksidan tampon sisteminin yetersizliği sonucu ortaya çıkar. Reaktif oksijen ve radikallerinin seviyelerindeki artış ise hücrelere toksik etki yapar ve hücrenin lipid, protein ve DNA benzeri moleküllerine zarar verir.

Yöntemin esası, örnekteki oksidanların ferroz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromatojen madde ile renk oluşturması esasına dayanır.⁽⁵⁸⁾ Spektrofotometrik olarak ölçülen rengin yoğunluğu örnekteki oksidan moleküllerin total miktarı ile ilişkilidir.

2.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total oksidanların, total antioksidanlara bölünmesi ile elde edilen oransal bir indekstir. OSİ'nin yüksek olması oksidatif stresin arttığını gösterir. OSİ bir oksidatif stres indikatörüdür.

2.9. Miyokardiyal İskemi/Reperfüzyon (İ/R)

Miyokardiyal iskemi çeşitli fizyolojik veya terapötik girişimler sonucunda oldukça sık karşılaşılmaktadır. Ateroskleroz veya tromboembolizm sonucu

gelişen akut MI'da olabildiği gibi perkütan translüminal koroner anjiyoplasti (PTCA), koroner arter baypas cerrahisi (CABG), aort cerrahisi, kardiyak transplantasyonlar gibi çeşitli durumlarda da miyokardiyal iskemi karşımıza çıkabilmektedir. İskemi sırasında miyokardın enerji dengesi kısa sürede bozulur ve kalpte sekiz saniyede aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya geçiş gerçekleşir. İskemik sahada miyokard kontraksiyonları azalır. Hücre membran potansiyelinin azalması ile EKG değişiklikleri ortaya çıkar. ⁽⁶⁰⁾ Miyokardiyal iskemi için kritik zaman 20 dakika olarak kabul edilir. 20 dakikadan daha kısa süreli olan iskemilerden sonra sağlanan reperfüzyon durumlarında doku hasarının kanıtı olan herhangi bir yapısal veya biyokimyasal bulgu saptanmamıştır. Miyokardiyal iskemi 20 dakikadan daha az süreyle oluşursa reperfüzyonda etkilenen dokularda hücre yapısı, fonksiyonu ve metabolizmasında geçici değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler miyokardiyal kontraktilitede depresyona yol açar.⁽³⁵⁾ 10 dakikalık iskemi sonrasında intrasellüler ortamda laktat ve H⁺ iyonu birikmesi sonucu Ph 5.8'e kadar düşer. Hücre içinde inorganik fosfat, kreatin, laktat gibi osmotik olarak aktif maddelerin birikmesi sonucu, hücreye doğru sıvı kayar (swelling process=hücre şişmesi). Miyokard hücresinde biriken adenosin difosfat (ADP), adenosin ve inozine kadar hidrolize uğrar. Bu işlem sırasında ortamda büyük oranda proton üretilir. Hücre pH'sının azalması (asidoz) sırasında glikoliz inhibe olur. Genellikle ciddi ve uzun süreli iskemi ile ATP depolarının %80 veya daha fazlası kaybolursa hücre membranının iyon bütünlüğünü koruma ve idame ettirme mekanizması kaybolur.

İskemik alana kan akımı yeniden sağlanmazsa geriye dönüşümsüz miyokard hasarı (nekroz) meydana gelir.⁽⁶¹⁾

Yirmi dakikadan daha uzun süren iskemiden sonra oluşan reperfüzyon hasarında miyokardiyal hücreler ölür. Doku nekrozu iskemik miyokardın subendokardiyal bölgesinden başlar ve subepikardiyal bölgeye doğru uzanır. Koroner kan akımının yeniden sağlanması sonucu iskemik dokudan toksik oksijen metabolitleri salınır. SOR tarafından oluşturulan hücre membran ve sarkoplazmik retikulum hasarı intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunda net artışla sonuçlanır. Kontraktil elemanların kalsiyuma karşı duyarlılığı azalır ve miyosit kontraktilitesi deprese olur.^(28,62,63)

Uzamış iskemiden sonra kalp kasında reperfüzyon ile yaşayan hücrelerde tekrar aerobik metabolizmaya geçiş ve hücrelerin kurtulması meydana gelir. Dokuda reaktif hiperemi gelişmesi ile ortaya çıkan substratlar dolaşımında 4-6 kat artar. Hücrede serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasıyla medikal tedaviye dirençli ciddi aritmi, mikrovasküler hasar, miyokardiyal stunning ve miyokardiyal hibernasyon meydana gelir.⁽⁶⁴⁾

Miyokardiyal İ/R olaylarında serbest oksijen radikali oluşumunda intrasellüler enzimatik mekanizmalar gerçekleşir. Bunlar; ksantinoksidaz, mitokondriyal sitokrom oksidazyolu siklooksijenaz, lipoksijenaz ve katekolamin oksidasyonudur. İskemik dokunun reperfüzyonu, hasarlı bölgede, nötrofillerin hızlı birikimine neden olur. Nötrofiller vasküler endotele yapışır, ekstrasvasküler sahaya geçer, serbest oksijen radikali oluşumu ve proteolitik enzimlerin salınımına yol açarak canlı hücreler üzerinde olumsuz etki oluşturur.

GSH redoks siklusu kalpteki majör antioksidan savunma sistemidir. GSH-Px elektron vericisi olarak GSH'ı kullanarak H_2O_2 ve lipid peroksitleri metabolize eder. Oluşan reaktif oksijen radikalleri ile GSH'ın reaksiyonu GSSH oluşumuna öncülük eder. Oluşan GSSH, glutatyon redüktaz tarafından GSH'a dönüştürülür. Miyokardiyum reperfüzyonla birlikte fazla miktarda oluşan oksijen radikallerine maruz kalır, bu durum koruyucu sistemleri baskılayabilir. ^(25,32,33)

Endotelde yapılan fonksiyonel çalışmalarda, hipoksinin endotel hücrelerinde hasar oluşturduğu görülmüştür. Arterin yeniden açılmasından sonraki 150 saniye içinde NO'nın endotelden salınımında belirgin artış gözlemlenmektedir. NO, platelet agregasyonunu ve plateletlerde GMP-siklaz'da direkt etki ile degranülasyonu inhibe eder. Aktive endotel, lökositler ve monositlerde adezyon moleküllerinin oluşumu azalır. ⁽⁶⁵⁾ İskemik miyokard dokusunun reperfüzyonu ile birlikte inflamatuvar süreç başlar. Aktive lökositler iskemik doku içine girerler. Aktive nötrofiller aktive plateletlerle birlikte hasarlanmış damar duvarına yapışırlar ve membrana bağımlı NADPH oksidaz tarafından süperoksit oluştururlar. ⁽⁶⁶⁾ Aktive nötrofiller, IL-1 β ve TNF- α gibi iki önemli proinflamatuvar sitokinin kaynağıdır. Reperfüzyondan sonra hücre içi pH'da azalma sonucu endotel hücrelerinde ödem ve önemli şekil değişiklikleri oluşur.

2.10. No-reflow Fenomeni

İlk defa 1968 yılında Ames ve ark. tarafından tanımlanmıştır. ⁽⁶⁷⁾ Oklude olan koroner arterde tekrar yeterli antegrad akım sağlanmış olmasına rağmen miyokard dokusunda gerekli perfüzyonun sağlanamadığı multifaktöryel bir

durumdur.⁽⁴⁸⁾ Mikrovasküler perfüzyonun yetersizliğini gösterir.⁽²⁾ İskemiye maruz kalan dokudaki en hassas bölgelerden biri damar endotelidir ve iskemi süresi uzadıkça no-reflow gelişme olasılığı artar.

2.11. Miyokardiyal Stunning (sersemleme)

Miyokardiyal iskemi veya iskemi atakları sonrasında oluşan kontraktıl disfonksiyondaki geçici uzamadır. Reperfüzyon sonrası irreversibl hasar olmamasına ve koroner perfüzyonun normal veya normale yakın olmasına rağmen devam eden mekanik disfonksiyondur. İlk kez Heyndrickx ve ark. tarafından 1975 yılında köpeklerde kısa koroner oklüzyon yaparak tanımlanmıştır.⁽⁶⁸⁾ Miyokardiyal stunning oluşumu ile ilgili çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır.^(47,68) En geçerli hipotez oksijen ve kalsiyum toksisitesidir. Reperfüzyon safhasında serbest oksijen radikalleri savunma mekanizmalarının kapasitesini aşar ve bu durum oksidatif stres ile sonuçlanır. Sarkoplazmik retikulum veya sarkolemmal seviyede membran hasarı oluşur ve kalsiyum homeostazisi değişir. Hücresel seviyede histopatolojik anormallikler saptanmaz. Tekrarlayan stunning'e bağlı sol ventrikül disfonksiyonunda, koroner arter hastalarında aynı bölgede sık tekrarlayan iskemi atakları sonucu miyokardiyal hibernasyon gelişmektedir

2.12. Miyokardiyal Hibernasyon

Uzun süreli azalmış kan akımı veya artmış oksijen talebi ile seyreden uzamış kontraktıl disfonksiyondur. Miyokardiyal stunning'in tekrarlayıcı

ataklarından sonra ortaya çıkar. Başlangıçta kronik stunning olarak değerlendirilmiştir. Stunning ve hibernasyonun ortak özelliği sol ventrikül disfonksiyonunun reversibl olmasıdır. Tekrarlayan stunning'ın son safhası ve daha az stabil, daha az reversibl bir formu olarak kabul edilir. Biyopsilerde miyofibril içeriğinin kaybı, hücrel şişme ve artmış glikojen içeriği, kontraktil proteinlerde bozulma ve miyokardiyal apoptoziste artış saptanmıştır.

2.13. Diyabetes Mellitus (DM)

Diyabetes Mellitus çoklu etiyolojiye sahip metabolik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi ile birlikte insülin sekresyonu, insülin aktivasyonu veya her ikisinin bozulması sonucu şekillenen karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki hasar ile karakterizedir.⁽⁶⁹⁾ Diyabet özellikle körlüğe neden olabilecek retinopatinin özel mikrovasküler komplikasyonlarının, potansiyel böbrek yetmezliği ile birlikte nefropati ve nöropatinin gelişimi ile ilişkilidir. İkincil olarak diyabetik ayak, otonom sinir disfonksiyonu oluşturma riski taşır. Bununla beraber diyabet makrovasküler hastalık risklerini artırabilmektedir.⁽⁷⁰⁾

Tip 1 DM: İnsülin sekresyonu yokluğuna bağlıdır. İnsüline bağımlı diyabet olarak da adlandırılır.

Tip 2 DM: Hedef dokuların insülinin metabolik etkilerine karşı duyarlılıklarının azalmasına bağlı olarak gelişir. İnsüline bağlı olmayan diyabet olarak da adlandırılır.⁽⁷⁰⁾

2.14. Diyabetes Mellitus Komplikasyonları

Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları gözlenmektedir.

1. Akut Komplikasyonlar:

Diyabetik ketoasidoz (DKA) ve nonketotik hiperosmolar durum (NKHD) diyabetin akut komplikasyonlarıdır. DKA, derin insülin yetersizliği mevcut insülini etkisiz kılan yüksek düzeydeki düzenleyici karşıt hormonlar ile (glukagon, büyüme hormonu, kortizol) birleşince meydana gelir. DKA birincil olarak Tip 1 diyabet hastalarında gözlenir. DKA'nın primer özellikleri dehidratasyon, asidoz ve elektrolit tükenmesidir. NKHD ise çoğunlukla yaşlı Tip 2 diyabetik hastalarda gözlenir. En belirgin bulguları; poliüri, ortostatik hipotansiyon ve çeşitli nörolojik semptomlardır. İnsülin eksikliği ve yetersiz sıvı alımı gözlenir. İnsülin yetersizliği nedeni ile hepatik glikoz üretimi artar ve iskelet kasında glikoz kullanımı bozulur. Bu durum yetersiz sıvı alımının şiddetlendirdiği intravasküler volüm azalmasının belirginleşmesine neden olur. ^(71,72)

2. Kronik Komplikasyonlar:

Diyabetin kronik komplikasyonları birçok organ sistemini etkileyebilir ve diyabetle ilişkili morbidite ve mortalitenin birçoğundan sorumludur. Kronik komplikasyonlar vasküler ve nonvasküler olarak sınıflandırılabilir. Vasküler komplikasyonlar da ayrıca mikrovasküler (retinopati, nöropati, nefropati) ve makrovasküler komplikasyonlar olarak (koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalık, serebrovasküler hastalık) olarak sınıflandırılabilir. Nonvasküler

komplasyonlar ise gastroparezi, seksüel disfonksiyon ve deri değışiklikleri gibi problemlerdir.^(71,72)

Hastalık çoğunlukla vasküler sistemi etkilemektedir. Makrovasküler ve mikrovasküler tutulum sonucu birçok doku ve organ sisteminde bozukluklar oluşur. Makrovasküler hastalıklar aslında aterosklerozun hızlanmış formudur. Enfarktüs, inme ve periferik gangren insidansının artışına sebep olur. Mikrovasküler hastalık kapiller ve prekapiller arteriyollerin hastalığıdır. Bazal membran kalınlaşması ile oluşur. Diyabetik retinopati ve nefropati mikrovasküler hastalık sonucu oluşur.⁽⁷³⁾

Diyabette hiperglisemiye bağı olarak serbest oksijen radikal üretiminin ve lipid, protein ve nükleik asitlerin oksidasyonun veya peroksidasyonunun arttığı, antioksidan savunma sistemi yetersiz olduğu, serbest radikal üretiminin artması ise diyabet komplasyonlarının başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunduğu bilinmektedir.⁽⁷³⁾

2.15. Deneysel Diyabet Modelleri ve Serbest Radikaller

Deney hayvanlarında deneysel diyabet oluşturulması cerrahi yolla, kimyasal ajanlarla, spontan olarak, genetik olarak veya virüs aracılığıyla yapılabilmektedir.⁽⁷⁴⁾

Diyabetin ortaya çıkışında oksidasyonun rolü olduğuna dair bulguların çoğu deneysel diyabette kullanılan iki ilaç olan alloksan ve streptozotosin (STZ) ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde meydana getirerek Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip

ederler. Hücre tarafından yeterli miktarda tutulan alloksan, askorbat ve tiollerle reaksiyona girerek onların antioksidan etkilerini engeller ve oksidanların üretimi ile beta hücre hasarına neden olur. STZ' nin etki mekanizması ise daha az anlaşılmıştır. Ancak STZ' nin uygun olmayan NO cevapları meydana getirdiği, NO cevabının neden olduğu adacık hücre yıkımının artmasının diyabeti oluşturduğu düşünülmektedir. Diyabetes mellitusun başlangıcında sıklıkla pankreas adacık hücrelerinde inflamasyon vardır ve bu inflamasyonda fagositlerden salınan serbest radikaller önemli rol oynar. Sitokinler de beta hücrelerinde serbest radikallerin oluşumuna yol açarlar. ^(75,76,77,78)

Oksidatif stres, diyabetik komplikasyonlar ve diyabetin altında yatan bir mekanizma olarak değerlendirilir. Diyabetlilerde protein glikasyonu ve glukoz oto-oksidasyonu sonradan lipid peroksidasyonunu katalizleyen reaksiyonlar ile serbest radikaller üretebilir. ^(79,80) Bunların yanı sıra diyabetlilerde antioksidan savunma sisteminin bozuklukları gösterilmiştir; antioksidan enzimlerde değişiklik, bozulmuş glutatyon mekanizması ve azalmış askorbik asit seviyeleri görülmektedir. ^(81,82)

Reaktif oksijen bileşikleri diyabetlilerde yüksektir. Bunun ana kaynakları glukoz otooksidasyonunun ve metabolitlerin de dahil olduğu metaboliklerdir. Bunların yanı sıra ilerlemiş glikasyon, değişken prostanoit üretimi ve anormal veya etkisiz mitokondriyal fonksiyon vardır. ⁽⁸³⁾

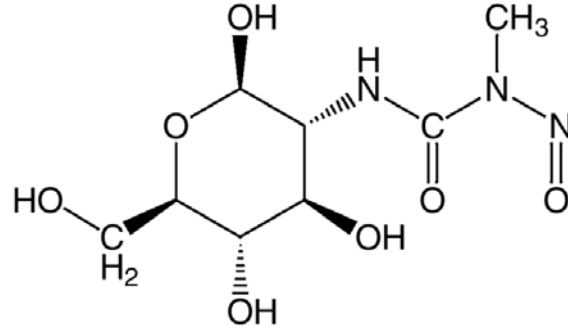
Oldukça önemli bir metabolik düzensizlik olarak bilinen ve hiperglisemi ile karakterize edilen diyabet olgularında serbest radikal oluşumunda artış olmaktadır. Diyabette serbest radikal üretiminin arttığı ve radikal bağlayıcı

sistemlerde azalma olduğu ileri sür÷lmüştür. Bu gelişmeler diyabet komplikasyonlarının patogenezinde serbest radikallere olan ilgiyi arttırmıştır. ⁽⁸⁴⁾

2.16. Streptozotosin (STZ)

N-(Metilnitrosokarbamoil)- α -D-glukozamin yapısındadır ve ışıktan korunmalıdır. Nötral pH’da hızla dekompoze olduğundan optimum stabilitesi için ortamın pH’sı 4-4.5 olmalıdır. Bu nedenle STZ çözündürülürken sitrat tamponu kullanılmalıdır. Pankreas β hücrelerini hasarlayarak hem insüline bağımlı hem de insüliniden bağımsız diyabete neden olmaktadır.

Streptozotosin toksisitesi, metilnitrozoüre parçacığının DNA alkilleme aktivitesine bağlıdır. Streptozotosinden DNA molekülüne metil grup transferi, tanımlanan zincir boyunca DNA’nın fragmantasyonu ile sonuçlanan hasarlar meydana getirir. ⁽⁸⁵⁾ Ayrıca ortamdaki protein glikozilasyonu ek yıkıcı faktör olarak davranmaktadır. DNA tamir edileceği zaman (ADP-riboz) polimeraz (PARP) aşırı bir şekilde stimule edilir. Bu durumda hücrel NAD⁺ seviyeleri ve ATP depoları azalır. Hücrel enerji depolarının sonunda bitmesiyle birlikte β hücrelerinde nekrozis şekillenir. STZ proteinleri de metillemesine rağmen, DNA metilasyonu β hücre ölümünün esas sorumlusudur fakat muhtemelen olan protein metilasyonunun, STZ’ye maruz kalan β hücrelerindeki fonksiyonel kayba katkıda bulunduğudur. ⁽⁸⁶⁾



Şekil 5. Streptozotosin moleküler formülü ($C_8H_{15}N_3O_7$)

2.17. Pikrozid II

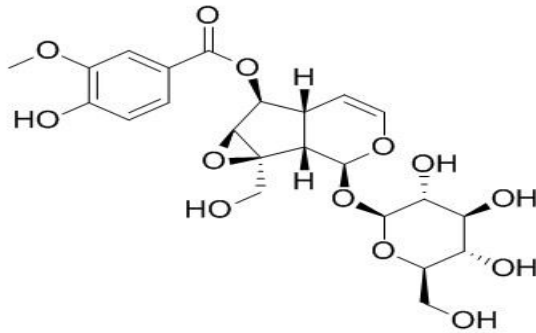
Picrorhiza kurroa, Nepal'in kuzey batı Himalayalar bölgesinde yaygın olarak bulunan Hindistan ve Çin'de sağlık alanında yaygın olarak kullanılan kök, gövde, yaprak ve meyveden oluşan 15-20 cm uzunluğunda kısa bir bitkidir.



Resim 1. Picrorhiza kurroa bitkisi

Picrorhiza kurroa'dan elde edilen Pikrozid I, Pikrozid II, ve Pikrozid III'den biyolojik aktif metaboliti olan bitkinin kökünden elde edilen Pikrozid II'dir. (87,88)

Pikrozid II, Picrorhiza kurroa'dan elde edilen $C_{23}H_{28}O_{13}$ moleküler formüllü bir glikozit türevidir.



Şekil 6. Pikrozid II molekül formülü

Pikrozid II'nin yapılan çalışmalarda anti-oksidan, anti-apoptotik ve anti-enflamatuar gibi birçok farmakolojik etkisi gösterilmiştir. (91,92)

Toll benzeri reseptörler (TLR); polimorfonükleer nötrofiller, monosit, makrofaj, dentritik hücreler gibi bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde bulunur (91,92) ve TLR sinyal yolu, sitokin üretimi ve proliferasyon dahil olmak üzere efektör tepkilerini artırır. (92) Pikrozid II'nin hasarlı beyin dokusunda inflamasyonu tetikleyen TLR 2 ve TLR 4 ekspresyonunu inhibe ederek iskemi reperfüzyonun neden olduğu beyin hasarını hafifletir. (93)

Pikrozid II oksidatif stres ve inflammatuar süreçte azalma sağlayarak böbrek dokusu üzerine de koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. (94) Yapılan çalışmalarda proinflammatuar sitokinlerden $TNF-\alpha$, ve $IL-1\beta$ gibi proinflammatuar sitokinlerle,

ICAM gibi adezyon moleküllerinin (ICAM1 mRNA) düzeylerinin pikrozid II ile azaldığı gözlenmiştir. ⁽⁹⁴⁾ Pikrozid II' nin hasarlanmış dokuda MDA düzeyindeki yükselmeyi azalttığı ve SOD, GSH-Px'i artırdığı görülmüştür. ^(94,95)

NF-kB (nükleer faktör kappa B); immün yanıtta yer alan, hücre proliferasyonuna ve apoptoza katılan yaygın bulunan enhancer bağlayıcı bir transkripsiyon faktörü olup, 50 ve 65 kDa alt birimlerden (p50 ve p65) oluşur. ⁽⁹⁶⁾ Pikrozid II, TLR4 / NF-kB yolunun blokajını sağlayarak antienflamatuar etkinlik gösterir. ⁽⁹⁴⁾

PI-3 K Fosfoinositid 3 Kinaz- protein kinaz B (PI3K/Akt) sinyal yolağının aktivasyonu sonrasında iki nedenden ötürü; endotel hücrelerinde NO sentaz fosforillenmesi sonucu NO üretiminde artma ve damar düz kas hücrelerinin kalsiyum konsantrasyonunda, miyozin hafif zincirinin kalsiyuma duyarlılığında azalma ile damar genişlemesi görülür. ⁽⁹⁸⁾ Pikrozid II; PI3K/Akt sinyal yolağını aktifleyerek, iskemik miyokard dokusunda, kalbin fonksiyonel iyileşmeyi artırdığı düşünülen NO' nun düzeyini artırır. ⁽⁹⁸⁾

Pikrozid II' nin iskemi reperfüzyon hasarının neden olduğu apaptosizi, Bcl-2 ekspresyonunu artırıp, Bax ekspresyonunu azaltmasının yanında bir transkripsiyon faktörü olan CREB' i (cAMP response element binding protein) ve PI3K/Akt yolağını fosforilleyerek aktiflemesi yolu ile inhibe eder. ⁽⁹⁹⁾

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu deneysel çalışmada Streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda LAD iskemisi öncesi intraperitoneal olarak uygulanan Pikrozid II'nin miyokardı iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı koruyup korumadığının gösterilmesi çalışıldı.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde (GÜDAM), Mayıs 2015 tarihinde gerçekleştirildi.

3.3. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 23/01/2015 tarih, 66332047-604.01.02 sayılı, G.Ü.ET-15.009 kod numaralı onayı doğrultusunda gerçekleştirildi.

3.4. Kullanılan Denek Materyali

Bu çalışmada kullanılan ratlar Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan 30 adet Wistar-Albino cinsi, 6–8 haftalık erkek (210–300 g) ratların bakım ve beslemeleri çalışma boyunca 24° çevre sıcaklığı, %

55–60 nem ve 12:12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü şartlarında gerçekleştirildi. Kuru pellet yemle besleme ve günlük taze su temini sürekli sağlandı.

3.5. Denek Grupları ve Uygulama Protokolü

Sham Grubu (Gr I, n=6): Bu gruptaki ratlara miyokard iskemisi yapılmaksızın sadece sol torokotomi yapıp kapatıldı, işlemden iki saat sonra anestezi altında ratların miyokard kasları çıkarıldı ve bu dokularda biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Diyabet-Sham Grubu (Gr II, n=6): Diyabet oluşturulan gruptaki ratlara miyokard iskemisi yapılmaksızın sadece sol torokotomi yapıp kapatıldı, işlemden iki saat sonra anestezi altında ratların miyokard kasları çıkartıldı ve bu dokularda biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Diyabet-İskemi Grubu (Gr IV, n=6): Diyabet oluşturulan bu gruptaki ratlarda sol torokotomi sonrasında 60 dakika süre ile LAD ligasyonu ile miyokard kasında iskemi gerçekleştirildi. 60 dakikalık iskemiyi takiben LAD ligasyonu kaldırıldı. İşlemden iki saat sonra anestezi altında ratların miyokard kasları çıkartıldı ve bu dokularda biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Diyabet- Pikrozid II Grubu (Gr III, n=6): Diyabet oluşturulan gruptaki ratlara miyokart iskemisi yapılmaksızın Pikrozid II 10 mg/kg intaperitoneal yolla uygulandı sadece sol torokotomi yapıldı ve kapatıldı, işlemden iki saat sonra anestezi altında ratların miyokard kasları çıkartıldı ve bu dokularda biyokimyasal değerlendirmeler yapıldı.

Diyabet-İskemik ve Pikrozid II Grubu (Gr V, n=6): Diyabet oluşturulan bu gruptaki ratlarda iskemiden 30 dakika önce Pikrozid II 10 mg/kg intraperitoneal yolla uygulandı. Ratlarda sol torokotomi sonrasında 60 dakika süre ile LAD Ligasyonu ile miyokardiyal iskemik gerçekleştirildi. 60 dakikalık iskemiyi takiben ligasyon kaldırıldı. İşlemi takiben ikinci saatte anestezi altında ratların miyokartları çıkartıldı ve bu dokularda biyokimyasal değerlendirme yapıldı.

3.6. Streptozotosin (Stz) ile Diabetes Mellitus Oluşturulması

Çalışmamızda moleküler formülü $C_8H_{15}N_3O_7$, $\geq 75\%$ α -anomer baz, $\geq 98\%$ yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) olan toz formunda STZ kullanıldı (Sigma Aldrich, CAS N:18883-66-4 Almanya). Enjeksiyondan önce deneklerin başlangıç ağırlıkları (gr) ve bazal kan glikoz değerleri (mg/dl) glukometre ile ölçüldü. Bazal kan glikoz değerleri için kuyruk veninden kan örnekleri alındı. Daha sonra deneklere intraperitoneal olarak sodyum sitrat (Ph 4.5) içinde çözünmüş olan 45 mg/kg Streptozotosin (STZ) tek doz olarak uygulandı.⁽¹⁰⁰⁾ Uygulamayı takip eden 72. saatte, deneklerin kuyruk veninden alınan kan örnekleri glukometre kullanılarak kan glikoz değerleri ölçüldü ve 250 mg/dl ve üzerinde bulunan ratlar diyabetik olarak kabul edildi. Kronik diyabet komplikasyonlarının ortaya çıkması için ratlar uygun koşullar altında bir ay süre ile tutuldu.

3.7. Pikrozid II'nin Hazırlanması ve Uygulanması

Pikrozid II, (safılık>% 98, molekül formülü $C_{23}H_{28}O_{13}$, Sigma Aldrich CAS N:39012-20-9, Almanya) fosfat tamponlu salin (PBS) ile 10 g/L' lik bir çözelti meydana getirmek üzere seyreltilti. Pikrozid II, 10 mg/kg olmak üzere Diyabet- Pikrozid II grubu ve Diyabet-İskemi ve Pikrozid II grubundaki ratlara iskemiden 30 dakika önce intraperitoneal yolla uygulandı. ⁽¹⁰¹⁾

3.8. Cerrahi Yöntem

Deney başlangıcında; intramusküler enjeksiyonla, 50 mg/kg dozda ketamine hydrochloride (Ketalar flakon®, Parke-Davis, USA) ve 10 mg/kg'dan xylazine hydrochloride (Alfazyne®,%2, Ege Vet) verilerek anestezi sağlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında, ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi. Supin pozisyonda yatırılıp cerrahi sahaları tıraş edildikten sonra boyun orta hatta yaklaşık 1 cm lik vertikal insizyon yapıldıktan sonra künt disseksiyonlarla trakeaya ulaşıldı ve 16 G intraket (Medipro Nova Cath® İstanbul, Türkiye) ile trakeostomi açıldı.(Resim 2) Mekanik ventilatöre (Harvard Apparatus Rodent Model Ventilator®, Inspiraasv, Hollstone, ABD) (Resim 3) bağlanan ratlara işlem süresince %100 oksijen ile tidal volüm 10-15 ml/kg ve solunum frekansı 65-80 dk olacak şekilde ventilasyon desteği sağlandı.

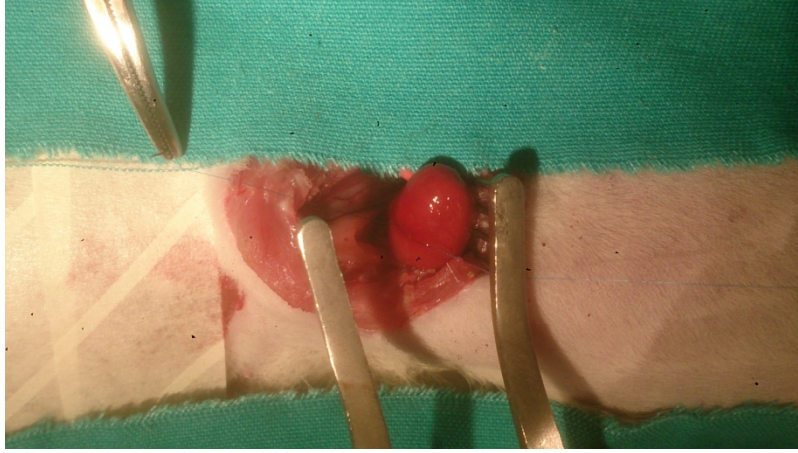


Resim 2.Trakeostomi açılması



Resim 3. Mekanik ventilatör

Sol 4. İnterkostal aralıktan yapılan insizyonla torokotomi yapıldı. Perikard zarı soyuldu LAD sahasından 8/0 Prolenle geçilerek iskemi yapıldı.(Resim 4) İşlemden iki saat sonra tüm ratların kalbinin büyük damarları klemplenerek kalpleri çıkarılmak suretiyle ötanazi uygulandı, çıkarılan dokular -80° de derin dondurucuda (SANYO MDF-U2086S®) eppendorf tüpüne alınarak saklandı.



Resim 4. Miyokardiyal iskemi modeli

3.9. Dokuların Homojenizasyonu

–80° dondurucuda tutulan dokular sıvı azot dolu taşıyıcı kaba alındıktan sonra kullanılacak olan örnek eppendorf tüpünden çıkarıldı. Çözünmesine izin verilmeden dokular hızla hassas terazide tartılıp 22 numaralı bistüri ucu (PLUSMED®) kullanılarak 80-100 mg olarak ayrıldı. Alınan doku parçaları porselen havanda sıvı azot varlığında ezildi. Toz halindeki dokular homojenizasyon tüpüne aktarılıp üzerlerine; her bir gram doku için, dilüsyon 1/10 olacak şekilde 140 mM KCl solüsyonu eklendi. Homojenizasyonda ısı artışı olmaması için homojenizasyon tüpü kar dolu cam beher içinde tutularak, iki dakika süre ile 50 dönüş/dakika (rpm) hızda homojenizatör (Glas_Col K5424®) ile homojenizasyon işlemi tamamlandı. Homojenizat eppendorf tüpüne alındı. Eppendorf tüpleri parafilm ile kaplandıktan sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj (Hettich Mikro 200R®) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant başka bir eppendorf

tüpüne alınarak Total Oksidatif Seviyesi (TOS) ve Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ölçümleri yapıldı.

3.10. Total Antioksidan Status/ Seviye (TAS) Ölçümü

Total antioksidan seviye ölçümünde, TAS kiti (RelAssay Diagnostic®, Türkiye) kullanıldı. TAS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, 500 mL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 mL örnek karıştırılıp spektrofotometre ile (NanoDrop® ND-1000), 660 nm’de absorbans ölçümü yapıldı (A1). Eppendorf tüpündeki karışıma 75 mL reaktif 2 (renkli 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit),(ABTS) solüsyonu eklendi. Tüp parafilmle kaplanarak, 37 ° deki sıcak su banyosunda (Şimşek Labortechnik®) 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 660 nm’de absorbans ölçümü yapıldı (A2). Standart ölçümü için, 1 mmol/L konsantrasyonundaki Trolox Eq çözeltisi örnek yerine kullanıldı. İlk ve ikinci ölçümler üçer defa yapılarak ortalaması alındı. İkinci absorbans değerinden (A2) ilk absorbans değeri (A1) çıkarılarak absorbans değişimi (Δ Abs) hesaplandı. TAS düzeyleri kitte belirtilen formülle hesaplandı ve mmol Trolox Eq/L olarak ifade edildi.

$$TAS = [(\Delta Abs \text{ H}_2\text{O} - \Delta Abs \text{ Örnek}) / (\Delta Abs \text{ H}_2\text{O} - \Delta Abs \text{ Standart})]$$

3.11. Total Oksidatif Status/ Seviye (TOS) Ölçümü

Total oksidan seviye ölçümünde, TOS kiti (RelAssay Diagnostic®, Türkiye) kullanıldı. TOS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, 500 mL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 mL örnek karıştırılıp spektrofotometre

(NanoDrop® ND-1000) ile 530 nm’de absorbansı ölçümü yapıldı (A1). Karışıma 25 mL reaktif 2 (pro-kromojen solüsyon) eklendi. Tüp parafilmle kaplanarak 37°C’deki sıcak su banyosunda (Şimşek Labortechnik®) 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 530 nm’de absorbans ölçümü yapıldı (A2). Standart ölçümü için kitte verilen, 10 µmol/L hidrojen peroksit (H₂O₂) ekivalan/ litre içeren standart çözeltisi kullanıldı. İlk ve ikinci ölçümler üçer defa yapılarak ortalaması alındı. İkinci absorbans değerinden (A2) ilk absorbans değeri (A1) çıkarılarak absorbans değişimi (ΔAbs) hesaplandı. TOS düzeyleri kitte belirtilen formülle hesaplandı, mmol H₂O₂ Eq/L olarak ifade edildi.

$$\text{TOS} = [(\Delta\text{Abs örnek}) / (\Delta\text{Abs standart})] \times \text{Standart Konsantrasyonu (10 µmol/L)}$$

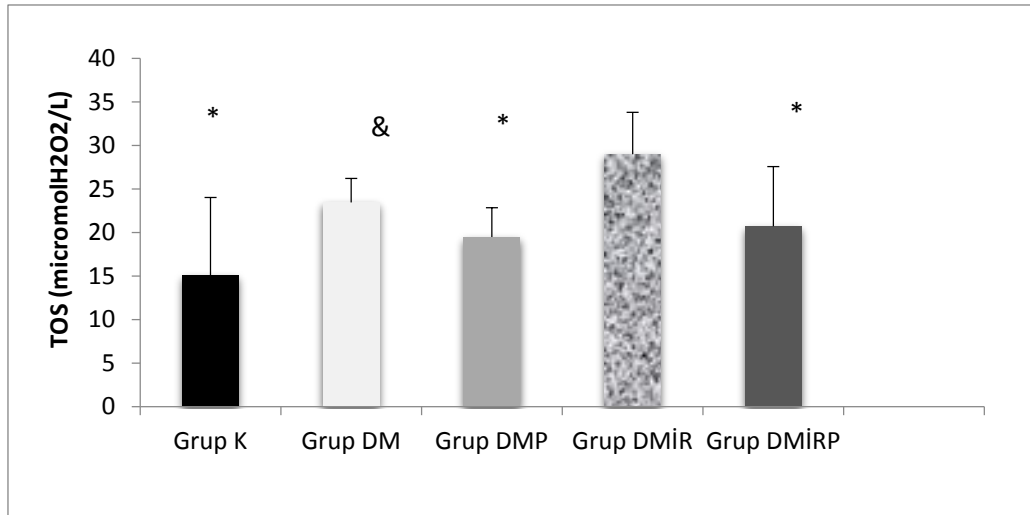
3.12. İstatistiksel Analiz

İstatistik değerlendirme SPSS 20.0 bilgisayar programında sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz verileri [Ortalama ± standart sapma] olarak sunuldu. Yapılan tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık sınırı olarak p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

Ölçülebilen parametrelere Kolmogorov-Smirnov testi uygulanarak dağılımın normal ya da anormal olup olmadığı belirlendi. Normal dağılım gösterenler için gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemede bağımsız gruplarda Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Farklılık olması durumunda gruplar arası Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılma yapıldı.

4. BULGULAR

Gruplar (kalp dokusu) TOS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.026$). TOS enzim aktivitesi DM-İ/R grubunda K, DM-P ve DM-İ/R-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu ($p=0.001$, $p=0.019$, $p=0.031$, sırasıyla). Ayrıca, DM grubunda TOS enzim aktivitesi K grubuna göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ($p=0.023$) (Tablo 4.2, Şekil 4.7).



* $p<0.05$: Grup DM-İR ile karşılaştırıldığında; & $p<0.05$: Grup K ile karşılaştırıldığında

Grup K: Grup kontrol

Grup DM: Grup Diyabetes mellitus

Grup DMP: Grup Diyabetes mellitus pikrozid

Grup DM İR: Grup Diyabetes mellitus iskemi reperfüzyon

Grup DM İRP: Grup Diyabetes mellitus iskemi reperfüzyon pikrozid

Şekil 7. Kalp dokusu TOS verileri

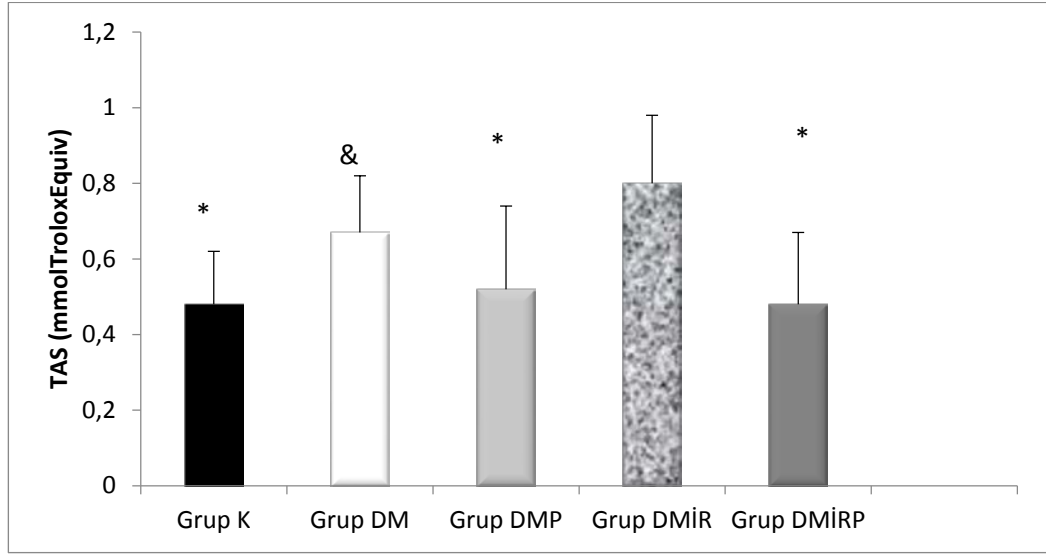
Tablo 2. Ratların kalp dokusunda oksidan durum parametreleri [Mean $\pm$ SD)]

	Grup K (n=6)	Grup DM (n=6)	Grup DM-P (n=6)	Grup DM-İ/R (n=6)	Grup DM-İ/R- P(n=6)	P**
TOS (mmol H ₂ O ₂ Eq/l)	15.08 $\pm$ 8.95*	23.45 $\pm$ 2.76&	19.48 $\pm$ 3.37*	28.98 $\pm$ 4.83	20.72 $\pm$ 6.86*	0.026
TAS (mmol Trolox Eq/l)	0.48 $\pm$ 0.14*	0.67 $\pm$ 0.15&	0.52 $\pm$ 0.22*	0.80 $\pm$ 0.18	0.48 $\pm$ 0.19*	0.012

P**: Kruskal Wallis testi ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$

* $p < 0.05$: Grup DM-İ/R ile karşılaştırıldığında; & $p < 0.05$: Grup K ile karşılaştırıldığında

Gruplar (kalp dokusu) TAS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark vardı ($p=0.026$). TAS enzim aktivitesi DM-İ/R grubunda K, DM-P ve DM-İ/R-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ($p=0.006$ $p=0.024$, $p=0.007$, sırasıyla). Ayrıca, DM grubunda TAS enzim aktivitesi K grubuna göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ($p=0.032$) (Tablo 4.2, Şekil 4.8).



*p<0.05: Grup DM-İ/R ile karşılaştırıldığında; &p<0.05: Grup K ile karşılaştırıldığında

Grup K: Grup kontrol

Grup DM: Grup Diyabetes mellitus

Grup DMP: Grup Diyabetes mellitus pikrozid

Grup DM İR: Grup Diyabetes mellitus iskemi reperfüzyon

Grup DM İRP: Grup Diyabetes mellitus iskemi reperfüzyon pikrozid

Şekil 8. Kalp dokusu TAS verileri

5. TARTIŞMA

Normal sağlıklı koşullarda mevcut oksidan ve antioksidan sistemler denge halindedir. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması oksidatif stres olarak adlandırılır. ⁽⁵⁹⁾

Miyokardiyal iskemi, ateroskleroz veya tromboembolizm sonucu gelişen akut MI'da olabildiği gibi perkütan translüminal koroner anjiyoplasti, koroner arter baypas cerrahisi, aort cerrahisi gibi çeşitli durumlarla birlikte yapılan fizyolojik veya terapötik girişimler sonucunda oldukça sık olarak karşımıza çıkabilmektedir. Kritik iskemi zamanına ulaşılmadan meydana gelen reperfüzyonda oluşan İ/R hasarının patofizyolojik mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılmassa da bunda aşırı serbest radikal üretimi, hücre içi Ca^{++} iyon dengesizliği, polimorfonükleerlokositler, trombositler, mikrovasküler disfonksiyon, renin-anjiotensin sistemi ile kompleman sisteminin rolü olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. ⁽³⁾

İskemik alana oksijen sunumu sonucu oluşan en önemli toksik madde SOR' dir. ⁽²⁾ Reperfüzyon sonrası kan akımı yeniden sağlanır ise metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler dolaşım ile tüm vücuda yayılır. ⁽¹⁾ Reperfüzyonu takiben inflamatuvar yanıt meydana gelir. ⁽¹¹⁾ İskemi sonrası dokudaki inflamatuvar yanıtın şiddeti, uzak organlarda da aynı şiddette olabilir. İ/R hasarının uzak etkileri sıklıkla akciğer, karaciğer, böbrek ve kardiyovasküler sistemde gözlenir ve sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) ve multipl organ disfonksiyon sendromunun (MODS) gelişmesine sebep olabilir. SIRS ve MODS, yoğun bakım ünitelerinde % 30-40 ölümcül seyretmektedir. ⁽¹⁰²⁾

Güncel yaklaşımlarla kalbi İ/R hasarına karşı korumak kalp cerrahisinin en önemli hedeflerinden biri haline gelmiştir. Açık kalp cerrahisinde kardiyopulmoner baypasa bağlı iskemi reperfüzyon hasarı gelişimi kaçınılmazdır. ⁽¹⁰³⁾ Açık kalp cerrahisi sırasında kalbi iskemi reperfüzyon hasarına karşı korumanın en etkili rolü miyokard koruma kurallarının eksiksiz olarak uygulanmasıdır. ⁽¹⁰³⁾ Miyokardiyal koruma alanında çok önemli gelişmeler olmasına rağmen, reperfüzyon sırasında kullanılacak ideal ilaç, teknik, solüsyon veya metod henüz net olarak tanımlanmamış olmakla birlikte bu alanda birçok molekül araştırmacının ilgi odağı olmuştur.

İ/R'a bağlı lokal organ disfonksiyonunu açıklayan patofizyolojik mekanizmalardan reaktif oksijen türevleri ve inflamatuvar lökositlerin rolü çok fazla ilgi odağı olmuştur. Yapılan çalışmalarla; oksidanlar ve aktive olmuş lökositler, İ/R'a bağlı uzak organ hasarının mediatörleri olarak da gösterilmektedir. ^(104,105)

Son yıllarda İ/R hasarının sonuçları ve korunma yöntemleri birçok araştırmacı tarafından daha detaylı çalışılmış ve günümüzde bu çalışmalar yoğunlaşarak devam etmektedir. Miyokardiyal İ/R hasarının etyopatogenezindeki mekanizmaların kısmen açıklanmaya başlanması ile birlikte, İ/R hasarından korunmak için birçok madde gündeme gelmiştir. Bu çalışmada Pikrozid II' nin İ/R' bağlı lokal organ disfonksiyonu ve uzak organ hasarının başlıca aktörlerinden olan, reaktif oksijen türevleri ile koruyucu antioksidan mekanizmaları arasındaki dengeye etkisinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

Pikrozid II, Picrorhiza Kurroa' dan elde edilen $C_{23}H_{28}O_{13}$ moleküler formüllü bir glikozit türevidir. Pikrozid II'nin yapılan çalışmalarda anti-oksidan, anti-apatotik ve anti-enflamatuar gibi birçok farmakolojik etkisi gösterilmiştir. (91,92)

Pikrozid II'nin oksidatif stres ve inflammatuar süreçte azalma sağlayarak böbrek dokusu ve miyokard üzerine koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. (94,98)

Yapılan çalışmalarla TNF- α ve IL-1 β gibi proinflammatuar sitokinlerle, ICAM gibi adezyon moleküllerinin (ICAM1 mRNA) düzeylerinin pikrozid II ile azaldığı gözlenmiştir. (94) Pikrozid II' nin İ/R hasarı meydana gelmiş dokuda MDA düzeyindeki yükselmeyi azalttığı ve SOD, GSH-Px' i artırdığı görülmüştür. (94,95)

Pikrozid II'nin yapılan çalışmalarla beyin dokusunda inflamasyonu tetikleyen TLR-2 ve TLR-4 ekspresyonunu inhibe ederek İ/R' nun neden olduğu beyin hasarını hafiflettiği gözlenmiştir. (93)

Yapılan başka bir çalışma ile Pikrozid II'nin antienflamatuar etkinliği, hücre proliferasyonu ve apoptoza katılan bir transkripsiyon faktörü olan NF-kB ve TLR-4 yolunun blokajına neden olarak sağladığı gösterilmiştir. (94)

Pikrozid II'nin İ/R hasarının neden olduğu apoptosizi de inhibe ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. (99) Pikrozid II'nin Bcl-2 ekspresyonunu artırıp, Bax ekspresyonunu azaltmasının yanında bir transkripsiyon faktörü olan CREB'i ve PI3K/Akt yolağını fosforilleyerek aktiflemesi yolu ile apoptosizi inhibe ettiği gösterilmiştir.

Çalışmamızda antioksidan etkileri araştırılan güncel moleküllerden Pikrozid II'nin İ/R hasarına ve diyabetik modeller kullanılarak diyabetik oksidatif strese etkisi irdelenmiştir.

Diyabetes mellitus kronik hiperglisemi ile birlikte insulin sekresyonu, insulin aktivasyonu veya her ikisinin bozulması sonucu şekillenen karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki hasar ile karakterize, çoklu etiyolojiye sahip günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan metabolik bir hastalıktır.⁽⁶⁹⁾ Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir.

(106)

Ayrıca, uzun süreli hiperglisemiye bağlı olarak uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır.⁽⁷³⁾

Antioksidan savunma sisteminin bozuklukları gösterilen diyabetik olgularda; antioksidan enzimlerde değişiklik ve bozulmuş glutatyon mekanizması görülmektedir.^(81,82) Yapılan çalışmalarda oldukça önemli bir metabolik düzensizlik olarak bilinen ve hiperglisemi ile karakterize edilen diyabet olgularında serbest radikal oluşumunda artış görülmüştür. DM' da serbest radikal üretiminin arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülmüştür.

Deneysel çalışmalara bakıldığında, cerrahi, genetik ya da biyokimyasal uygulamalar (STZ, alloksan enjeksiyonu) ile diyabet oluşturulmaktadır. Çalışmamızda kullanılan ratlar, STZ ile diyabetik yapılp diyabetin kronik etkilerinin ortaya çıkması için otuz gün boyunca uygun ortamda tutuldu. Çalışmamızda STZ ile diyabetik yapılmış ratlarda ve kontrol grubunda; İ/R hasarına Pikrozid II etkisi ile oksidan antioksidan sistemler arasındaki ilişki incelenmiştir.

Çalışmamızda serbest radikallerin saldırısına karşı organizmadaki toplam antioksidan korumayı yansıtan TAS ve oksidatif stresin toplam değeri olan TOS belirteçleri kullanılmıştır. Yapılan alışmalarla TAS seviyesi ölümünün, antioksidanların tek tek ölümünden daha değerli bilgi verdiği görülmüştür. ^(57,58)

Çalışmamızdaki kalp dokuları, TOS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark saptandı. TOS enzim aktivitesi DM-İR grubunda K, DM-P ve DM-İR-P gruplarına göre anlamlı yüksek olarak bulundu. Gerek İ/R hasarının gerekse de DM'un etyolojisi ve komplikasyonlarının başlıca aktörü olan oksidatif stresin TOS lm ile Pikrozid II verilen gruplarda daha düşük olduğu tespit edilmiş olmakla birlikte DM grubunda, K grubuna göre anlamlı yükseklikte TOS aktivitesi saptanmış olup bu da mevcut çalışmalarla paralellik göstermekte ve DM'un oksidatif hasarını ortaya koymaktadır.

Ayrıca alışmamızda kalp dokusuları, TAS enzim aktivitesi açısından kendi aralarında kıyaslandığında, gruplar arasında anlamlı fark saptandı. TAS enzim aktivitesi DM-İR grubunda K, DM-P ve DM-İR-P gruplarına göre anlamlı

yüksek olarak tespit edildi ki bu da antioksidan sistemlerin DM ve İR hasarı ile bozulduğu yönündeki bilgilerle paralel olup Pikrozid II verilen gruplarda TAS enzim aktivitesinin düşük olması antioksidan sistemlerin korunduğu diğer bir değişle aktif olduğunu gösterir. Ayrıca, DM grubunda TAS enzim aktivitesi K grubuna göre anlamlı yüksek olarak tespit edildi ki bu da DM'lu olgulardaki antioksidan sistem bozukluğu ile örtüşür.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda STZ ile diyabet oluşturulan rat modelinde, Pikrozid II yapılan miyokard dokusunun biyokimyasal değerlendirmeleri sonucunda, DM'un neden olduğu oksidatif strese karşı antioksidan etkisi gösterilmiştir.

STZ ile diyabet ve İ/R hasarı oluşturulan rat modelinde miyokard dokusunda Pikrozid II'nin İ/R hasarına karşı koruyucu etkisi saptanmıştır.

Çalışmamızdaki bu bilgiler ışığında, Pikrozid II'nin İ/R hasarına karşı koruyucu etkilerinin başka çalışmalarla desteklenmesi gerektiği görüşündeyiz.

7. ÖZET

Streptozotosin İle Diyabet Oluşturulan Ratlarda Pikrozid II'nin Miyokard İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisi; İskemik dokunun kanlandırılmasından sonra ortaya çıkan reperfüzyon hasarının tedavisine yönelik bilimsel çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmada STZ ile diyabetes mellitus oluşturulan ratlarda pikrozid II'nin miyokard iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 30 adet Wistar-Albino cinsi, 6–8 haftalık erkek (210–300 g) rat kullanıldı. Denekler Sham, DM Sham, DM-Pikrozid II grubu, DM-İskemi grubu ve DM-İskemi-Pikrozid II grubu olmak üzere beş gruba ayrıldı. DM gruplarına STZ ile diyabet oluşturuldu. İ/R hasarı oluşturmak için sol koroner arterin inen dalına 60 dakika iskemi takibinde 2 saat reperfüzyon uygulandı. Pikrozid II gruplarına işlemden 30 dakika önce pikrozid II, 10 mg/kg olmak üzere intraperitoneal olarak verildi. Çıkarılan miyokard örneklerinde homojenizasyonun ardından TAS, TOS çalışması yapıldı.

Pikrozid II kullanımının total antioksidan kapasite ve total oksidatif stres üzerinde istatistiksel anlamlı etkisi olduğu tespit edildi. ($p=0.026$)

STZ ile diyabet ve İ/R hasarı oluşturulan rat modelinde miyokard dokusunda Pikrozid II'nin İ/R hasarına karşı koruyucu etkisi saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İskemi Reperfüzyon, Diyabetes Mellitus, Pikrozid II

8. ABSTRACT

The Effect Of Picroside II On Ischemia Reperfusion Injury In Myocart Streptozotosin Induced Diabetic Rats; The scientific studies for the treatment of reperfusion injury after perfusion of ischemic tissue have been increasing day by day. The aim of this study was to determine the effect of picroside II on myocardial ischemia reperfusion injury in STZ induced diabetic rats .

In the experiments, 30 Wistar-Albino, 6-8 week old male (210-300 g) rats were used. The subjects have been divided into five groups as; Sham, Sham DM, DM-Picroside II group, DM- Ischemia group and DM- Ischemia-Picroside II group. In diabetics groups diabetes was incuded by STZ. In order to I/R injury, we have performed 60 minutes ischemia and followed by 2 hours reperfusion to descending branch of the left coronary artery. Picroside II was injected intraperitoneally to Picroside II groups before ischemia process. After homogenization of samples extracted from myocardial tissue TAS, TOS work was done.

In total antioxidant capacity and total oxidative stress of Pikrozid use was found to have a statistically significant effect. ($p=0.026$)

Streptozotocin induced diabetic rats in the myocardial ischemia reperfusion injury pikrozid II over the protective effect was found.

Keywords: Ischemia Reperfusion, Diabetes Mellitus, Picroside II

9. KAYNAKLAR

1. Taş, A. Desfluran ve propofol anestezisinin rat hepatik iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki koruyucu etkilerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, Kasım 2010.
2. Duran E. Kalp ve Damar Cerrahisi. 1. Baskı. Edirne: Ekim 2004; cilt 1, 197.
3. A.L. Moens, M.J. Claeys, J.P. Timmermans, C.J. Vrints. Myocardial ischemia / reperfusion - injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. International Journal of Cardiology 2005;100: 179–190.
4. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. Free Radic Biol Med. 2000; 15;28(10):1456- 62.
5. Comparison of the protective effects of ferulic acid and its drug-containing plasma on primary cultured neonatal rat cardiomyocytes with hypoxia/reoxygenation injury. Pharmacogn Mag. 2013 Jul;9(35):202-9. doi: 10.4103/0973-1296.113264.
6. Siemionow M, Arslan E, Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsurgery. 2004;24:468-75.
7. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. Acta Univ Carol Med Monogr 1990; 137:1-53.
8. 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: 255-6.
9. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. Transplant Proc. 2002;34: 2518-9.
10. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. Br JSurg 1994;81:637-47.
11. Hergenç G. Kompleman Sisteminin Aterosklerozdaki Rolü. Arch TurkSoc Cardiol 2004; 32:28-37.
12. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. Shock 2004;21:401-9.

13. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clin Chim Acta* 2006;374: 33.
14. Frank MM. Complement and Kinin. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG (eds). *Basic and Clinical Immunology*. Beirut, Appleton and Lange. 1999;124-33.
15. Thrane AS, Skehan JD, Thrane PS. A novel interpretation of immunoredundancy and duality in reperfusion injury with important implications for intervention in ischaemic disease. *Med Hypotheses* 2007 68: 1363-1370.
16. Ibrahim SI, Chan RK, Hechtman HB. Ischemia-reperfusion injury. 761-7. Shepro D. *Microvascular Research*, Elsevier New York 2006.
17. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1990;68:989.
18. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;49:481-93.
19. Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 1993;49:700-18.
20. Erden M. Serbest radikaller. *T. Klinik Tıp Bilimleri Dergisi* 1992;12:201-7.
21. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983;94:415-22.
22. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach* Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland 1996.
23. Das UN. Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*; 215(1-2): 145-152 2000.
24. Morin D, Hauet T, Spedding M, Tillement JP. Mitochondria as target for anti-ischemic drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;49:151-174.
25. Becker LB. New concepts in active oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 461-470.
26. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The Am J Surg* 1991; 161: 488-503.

27. Kilgore KS, Lucchesi BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: The role of free radicals and the inflammatory response. *Clin Biochem* 1993; 26: 359-370.
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;4:154-167.
29. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 2000; 39:1529-1542.
30. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000,21;3:361-370.
31. Unno N, Fink MP. Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology Clinics* 1998,27;2:289-307.
32. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47: 446-456.
33. Maxwell SRJ, Lip GYH. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol* 1997; 58: 95-117.
34. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1-40.
35. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1905-1912.
36. Gaeta LM, Tozzi G, Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clin Chim Acta* 2002;322:117-120.
37. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm* 1994;NS34: 26-35.
38. Muzykantov VR. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Contr Release* 2001;71:1-21.
39. Seekamp A, Lalonde C, Zhu DG. Catalase prevents prostanoid release and lung lipid peroxidation after endotoxemia in sheep. *J Appl Physiol* 1988;65:1210-1216.

40. Altuntaş I, Delibaş N, Doğuç DK, Ozmen S, Gültekin. Role of reactive oxygen species inorganophosphate insecticide phosalone toxicity in erythrocytes invitro. *Toxicol in Vitro* 2003;17: 153-157.
41. Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Site N, Grune T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radical Biol Med* 1999;27: 1080-1086.
42. Girn HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, Homer-Vannia sinkam S. Reperfusion Syndrome: Cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential theraoeotic strategies. *Vasc Endovascular Surg* 2007;41:177-93.
43. Nelson SK, Gao B, Bose S, Rizeq M, Mc Cord JM. Anovel heparin-biding, human chimeric, superoxide dismutase improves myocardial preservation and protects from ischemia-reperfusioninjury. *JHeart Lung Transplant* 2002;21:1296- 1303.
44. Grisotto PC, dos Santos AC, Coutinho-Netto J, Cherri J, Piccinato CE, Indicators of oxidative injury and alternations of the cell membrane in sceletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. *J Surg Resc* 2000;92:1-6.
45. Morrow JD, HillKE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. Aseries of prostaglandin F-2 like compounds a reproduced invivo in humans byanon- cyclooxygenase, free radical-catalized mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87: 9383-9387.
46. Boyle EM, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Ischemia-Reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1997;64:S24-30.
47. AnselmiA, Abbate A, Girola F. Myocardial ischemia, stunning, inflammation and apoptosis during cardiac surgery: areview of evidence. *Eur J Cardio-thorac Surg* 2004;25:304-311.
48. Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990;265:659-65.
49. Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1ongutbarrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand J Gastroenterol* 2001, 36;1:55-65.
50. Tokgöz G. Sitokinler. *Klinik immünoloji* 1997;11: 85-100.
51. Barone FC, Arvin B, White RF. TNF- α : amediator of focal ischemic injury. *Stroke*1997;28: 1233-1244.

52. Dinarello CA. Biologic basis for IL-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147.
53. Pantoni L, Sarti C, Inzitari D. Cytokines and cell adhesion molecules in cerebral ischemia: experimental bases and therapeutic perspectives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18: 503-513.
54. Touzani O, Boutin H, Chuget J, Rothwell N. Potential mechanisms of IL-1 involvement in cerebral ischemia. *J. Neuroimmunol* 1999;100:203-215.
55. Rothwell N. IL-1 and neuronal injury: mechanisms, modification and therapeutic potential. *Brain Behav Immun* 2003;17:152-157.
56. Murat Rabus, Recep Demirbağ, Yusuf Sezen, Oğuz Konukoğlu, Ali Yıldız, Özcan Erel, Rahmi Zeybek, Cevat Yakut. Plasma and tissue oxidative stress index in patients with rheumatic and degenerative heart valve disease. *Türk kardiyol dern arş - arch turk soc cardiol* 2008;36(8):536-540
57. Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000 ; 29 (11): 1106-14.
58. Erel O.. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem. Apr* 2004;37(4):277-85.
59. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury . *J Androl* 2005;26(6):654-60.
60. Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *JM ol Cell Cardiol* 1986;18:769- 780.
61. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. İschemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 1990;66: 913-931.
62. Hearse DJ,Humphrey SM,Chain EB. Abruptre oxygenation of the anoxic potassium-arrested perfusedrat heart:astudy of myocardial enzyme release.*JMol Cell Cardiol* 1973;5:395-407.
63. Andreoli SP. Reactive oxygen molecules, oxidant injury andrenal disease. *Pediatr Nephrol* 1991;5:733-42.
64. Bolli R. The early and late phases of preconditioning against myocardial stunning and the essential role of oxyradicals in the latephase: anoverview. *Basic Res Cardiol* 1996; 91:57-63.

65. Corbucci GG, Lettieri B, Damonti V, Palombari R, Arienti G, Palmerini CA, Nitric oxide in ischemic and reperfused human muscle. *Clin Chim Acta* 2002;318:79- 82.
66. Biglioli P, Cannata A, Alamanni F. Biological effects of off-pumps on-pump coronary artery surgery: focus on inflammation, hemostasis and oxidative stress. *Eur J. Cardio-thorac Surg* 2003;24:260-269.
67. Ames A, Wright RL, Kowada M. Cerebral ischemia II, Theno-flow phenomen. *Am J Pathol* 1968;52: 437-453.
68. Heyndrickx GR, Millard RW, Mc Ritchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *JCl in Invest* 1975;56:978-85.
69. Diamond Project Group. Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabet Med* 2006 ;23: 857-866.
70. Barr RG, Nathan DM, Meigs JB, Singer DE. Tests of glycemia for the diagnosis of diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2002; 137: 263-272 .
71. Araz M, Diabetes Mellitus. In: Sağlıker Y, Ed. *Çocuk Hastalıkları Prensipleri*, 4. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2004; p. 2109-2123.
72. Cecil Tuzcu M, Cecil Essentials of Medicine Türkçesi. 1. Baskı, istanbul Nobel Tıp Kitabevi, 2000;533-545.
73. Gardner DG, Shoback D. Greenspan's Temel ve Klinik Endokrinoloji. 8. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2009:661-748.
74. Fröde TS, Medeiros YS. Animal models to drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2008;115:173-83.
75. Wollf S.P., 1993, Diabetes Mellitus and free radicals, *Br Med Bull*; 49, 642-652.
76. Godin D.V., Wohaieb S.A., Garnett M.E., Goumeniouk, AD., 1998, Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes, *Molecular and Cellular Biochemistry*; 84, 223-231.
77. Marklund S.L., Hagglof B., 1984, Plasma EC- superoxide dismutase activity in insulindependent diabetic children, *Clinica Chimica Acta*; 142, 299-305.
78. Hagglöf B., Marklund S.L., Holmgren G., 1983, CuZn Superoxide dismutase, Mn Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin dependent diabetic children. *Acta Endocrinologica*; 102: 235-9.

79. Mullarkey C.J., Edelstein D., Brownlee L., 1990, Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 173, 932-939.
80. Baynes J.W., 1991, Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes *Diabetes*; 40, 405-412.
81. Strain J.J., 1991, Disturbances of micronutrient and antioxidant status in diabetes, *Proc Nutr Soc.*, 50, 591-604.
82. McLennan S.V., Heffernan S., Wright L., Rae C., Fisher E., Yue DK., Turtle JR., 1991, Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes, *Diabetes*; 40, 344-348.
83. MacRury S.M., Gordon D., Wilson R., Bradley H., Gemmel CG., Paterson J.R., Rumley AG., MacCuish AC., 1993, A comparison of different methods of assessing free radical diabetes and peripheral vascular disease, *Diabetic Medicine*; 10, 331-335.
84. Ganong W.F., 1995, *Tıbbi Fizyoloji*. 16. baskı. engEditör: Doğan. A. Barış Kitabevi, İstanbul. Bölüm; 19, 365-386.
85. Murata M, Takahashi A, Saito I, Kawanishi S. Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 881-887.
86. Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 171-181.
87. Sud A, Chauhan RS, Tandon C. Identification of imperative enzymes by differential protein expression in *Picrorhiza kurroa* under metabolite accumulating and non-accumulating conditions 2013 Jul 1; 20(7):826-35.
88. Zhu J, Xue B, Ma B, Zhang Q, Liu M, Liu L, Yao D, Qi H, Wang Y, Ying H, Wu Z. A pre-clinical pharmacokinetic study in rats of three naturally occurring iridoid glycosides, Picroside-I, II and III, using a validated simultaneous HPLC-MS/MS assay. 2015 May 6; 993-994C:47-59
89. Cao Y, Liu JW, Yu YJ, Zheng PY, Zhang XD, Li T, Guo MC. Synergistic protective effect of picroside II and NGF on PC12 cells against oxidative stress induced by H₂O₂. *Pharmacol Rep.* 2007; 59:573-579.
90. He LJ, Liang M, Hou FF, Guo ZJ, Xie D, Zhang X. Ethanol extraction of *Picrorhiza scrophulariiflora* prevents renal injury in experimental diabetes via anti-inflammation action. *J Endocrinol.* 2009; 200:347-355. doi: 10.1677/JOE-08-0481.

91. Chang Z. Role of toll-like receptors in regulatory functions of T and B cells. *Chinese Science Bulletin*.2008;53(8):1121–1127.
92. Liu G, Zhang L, Zhao Y. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2010;160(2):168–175.
93. Wang Y, Ge P, Zhu Y. TLR2 and TLR4 in the brain injury caused by cerebral ischemia and reperfusion. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:124614
94. Lei Wang, Xiu-Heng Liu, Hui Chen, Zhi-Yuan Chen, Xiao-Dong Weng, Tao Qiu, and LIN LIU Department of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, P.R. China 10.3892/.2015.2225.
95. Gao H, Zhou YW. Anti-lipid peroxidation and protection of liver mitochondria against injuries by picoside II. *World J Gastroenterol*. 2005;11:3671–3674. doi: 10.3748/wjg.v11.i24.3671.
96. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*. Second edition. Canada: Elsevier 2007; 85-104.
97. Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:1597-1602.
98. Nan Wu, Wenna Li, Wenqi Shu, and Dalin Jia et al. 2014; 8: 545–554. Protective effect of picoside II on myocardial ischemia reperfusion injury in rats.
99. Meng FJ¹, Jiao SM, Yu B. 2012 Aug;30(2):263-70. Picoside II protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt and CREB pathways.
100. Kylie Kavanagh, David M. Flynn, Chris Nelson, Li Zhang, Janice D. Wagner Characterization and Validation of a Streptozotocin-Induced Diabetes Model in the Vervet Monkey *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2012 May 1. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2011 May; 63(3): 296–303.
101. Li Zhao, Xiaodan Li, Tingting Wang, Yunliang Guo, Fangfang Pang, Cuicui Chang The anti-inflammatory effect of picoside II and the optimizing of therapeutic dose and time window in cerebral ischemic injury in rats *Institute of Cerebrovascular Diseases, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, China* 2013 Vol.2, No.3, 46-53.
102. Neary P, Redmond HP: Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia Reperfusion Injury*. London, Blackwell Science, pp 1999 123-36.

103. Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-Reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255:1269-75.
104. Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE: Circulation xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1992;263:394-401.
105. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM (1992) Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Science* 50(5), 335-339.

10.EKLER

10.1. Etik Onay

Evrak Tarih ve Sayısı: 23/01/2015-8694



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Dilek ERER
Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Dilek ERER, Yücel POLAT, Mustafa ARSLAN, Ali Dursun DOĞAN, Abdullah ÖZER, Ayşegül KÜÇÜK, Mustafa KAVUTÇU, Aslıhan ÇAVUNT BAYRAKTAR'dan oluşan, G.Ü.ET-15.009 kod numaralı ve "**Streptozotosin ile diabet oluşturulan ratlarda pikrozid II'nin miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarına etkisi**" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim. *

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-15.009 and entitled "*The effect of picoside II on ischemia reperfusion injury in myocart streptozotosin induced diabetic rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
E-Posta :hadyek@gazi.edu.tr Web Adresi :http://dhek.gazi.edu.tr

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.